Die Rolle aktiver Sauerstoffspezies im Hydroxylierungsmechanismus intakter Mikrosomen

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Christoph Richter
aus Quedlinburg

1977

77 284

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523707_0084

Die Rolle aktiver Sauerstoffspezies im Hydroxylierungsmechanismus intakter Mikrosomen

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Christoph Richter
aus Quedlinburg

1977

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Mai 1977

Dekan : Prof. Dr. W. Zeil

1. Berichterstatter : Doz. Dr. A. Wendel

2. Berichterstatter : Prof. Dr. U. Weser

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Doz. Dr. A. Wendel am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen (Direktor Prof. Dr. Dr. G. Weitzel) und im Laboratorium von Prof. Dr. A. Azzi am Istituto di Patologia Generale, Università di Padova, Italien, durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Doz. Dr. A. Wendel für viele wertvolle Hinweise und Vorschläge sowie die Hilfe bei der Interpretation der Ergebnisse danken.

Besonderen Dank schulde ich Herrn Prof. Dr. A. Azzi dafür, daß er mir seine Laboreinrichtung zur Verfügung stellte und durch kritische Diskussionen im Verlauf der Arbeit zu deren Durchführung beigetragen hat. Die freundschaftliche Aufnahme in seinem Institut hat mich besonders gefreut.

Dr. R. Bisson, Dr. C. Montecucco und Dr. D. Pascolini danke ich für ihre Diskussionsbeiträge, Herrn M. Santato für die Isolierung der Mikrosomen, und Herrn Th. Mietner für die Anfertigung der Zeichnungen.

Die Studienstiftung des deutschen Volkes gewährte mir durch ein Promotionsstipendium materielle Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Dr. G. Weitzel als Institutsdirektor danke ich für sein Verständnis, das zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	Einführung	1
1.1.	Allgemeine Eigenschaften von Sauerstoff und Sauerstoffreaktionen	1
1.1.1.	Superoxid Radikale und Dismutation	2
1.1.2.	O_2^- Tests	5
1.1.3.	Zur physiologischen Bedeutung von O_2^-	6
1.1.4.	Wasserstoffperoxid	7
1.1.5.	OH$^\cdot$ Radikale	8
1.1.6.	Singlet Sauerstoff, O_2^*	9
1.2.	Reaktionen verschiedener Sauerstoffspezies untereinander	1o
1.2.1.	Thermodynamische Gesichtspunkte	1o
1.3.	Eigenschaften und Funktionen von Oxygenasen	13
1.3.1.	Klassifikation und allgemeine Eigenschaften	13
1.3.2.	Biologische Funktion von Oxygenasen	16
1.4.	Eigenschaften von Lebermikrosomen und mikrosomalen Monoxygenasen	17
1.4.1.	Cytochrom P-450 und P-448	17
1.4.2.	NADPH-Cytochrom P-450 Reduktase	2o
1.4.3.	NADH -Cytochrom b_5-Reduktase	21
1.4.4.	Phospholipidgehalt des P-450-Systems	21
1.4.5	Faktor X	22
1.4.6.	Möglicher Synergismus zwischen NADPH-Cytochrom P-450-Reduktase und NADH-Cytochrom b_5-Reduktase	22
1.4.7.	Stöchiometrie und Topologie in der Membran	24

Seite

1.5. Vorstellungen zum Mechanismus der Monoxygenase-Reaktion in Lebermikrosomen 25

1.6. Mechanismus der Hydroxylierung in einem rekonstituierten mikrosomalen Enzymsystem der Leber 28

1.7. Modellreaktionen zur Beteiligung von aktivierten Sauerstoffspezies an Hydroxylierungen 29

1.7.1. Allgemeine Gesichtspunkte der Fixierung von Sauerstoff 29

1.7.2. Modelle zur möglichen Natur des angeregten Sauerstoffs 3o

1.8. Carcinogenese durch polycyclische Kohlenwasserstoffe 32

1.9. Ziel der vorliegenden Arbeit 34

2. Experimenteller Teil 35

2.1. Material und Geräte 35

2.1.1. Verwendete Substanzen 35

2.1.2. Verwendete Geräte 37

2.2. Methoden 38

2.2.1. Puffer 38

2.2.2. Mikrosomenisolierung 38

2.2.3. Cytochromgehalt 39

2.2.4. Bestimmung enzymatischer Aktivitäten 39

2.2.4.1. NADPH-Cytochrom c Reduktase 39

2.2.4.2. NADPH-Cytochrom P-450 Reduktase 4o

2.2.4.3. Die Reduktase von Cytochrom b_5 4o

Seite

2.2.4.4. p-Nitroanisol O-Demethylase-Aktivität 4o
2.2.4.5. O-Dealkylierung von 7-Äthoxycoumarin 41
2.2.4.6. Die N-Demethylierung von Aminopyrin 41
2.2.4.7. Bestimmung von Formaldehyd 41
2.2.4.8. Benzo[α]pyren-Monoxygenaseaktivität 42
2.2.4.9. Nachweis von O_2^- Radikalen in Mikrosomen 44
2.2.4.10. Die Sauerstoffaufnahme 45
2.2.4.11. Die Kinetik der Bildung des "Ferryl-Intermediates" 46
2.2.4.12. Benzpyren-6-Phenoxyradikale 46
2.2.4.13. Bindungsstudie 46

3. Ergebnisse 47
==========

3.1. Bildung von Superoxidradikalen in Mikrosomen 47
3.1.1. Bestimmung mit Hilfe von acetyliertem Cytochrom c 47
3.1.2. Bestimmung mit Hilfe des Adrenalintests 47
3.2. Cytochrom P-450-abhängige Hydroxylierung in intakten Mikrosomen und Inhibierung durch O_2^--Quencher 5o
3.2.1. p-Nitroanisol O-Demethylierung und Inhibierung durch O_2^--Quencher 52
3.2.2. Aminopyrin N-Demethylierung und Inhibition durch den O_2^--Quencher Tyr_2-Cu^{2+} 54
3.2.3. 7-Äthoxycoumarin O-Deäthylierung und Inhibition durch den O_2^--Quencher Tyr_2-Cu^{2+} 54
3.2.4. Inhibierung mikrosomaler Dealkylierung durch entzündungshemmende und Superoxid Dismutase-aktive Cu^{2+}-Chelate 54

		Seite
3.3.	Zum Mechanismus der Inhibierung durch Tyr_2-Cu^{2+} und andere O_2^--Quencher	56
3.3.1.	Kinetische Untersuchungen des Inhibitionstyps und Bindungsspektren	57
3.3.2.	Untersuchungen zur Bindung von Tyr_2-Cu^{2+} an mikrosomales Protein	58
3.3.3.	Das NADPH-regenerierende System	59
3.3.4.	Transformation	60
3.3.5.	NADPH-Cytochrom c Reduktase	61
3.3.6.	Redoxzustand der mikrosomalen Hämproteine	63
3.3.6.1.	Zeitlicher Verlauf der Redoxvorgänge an Cytochrom b_5	63
3.3.6.2.	Ausmaß der Reduktion der Cytochrome	65
3.3.6.3.	Zeitlicher Verlauf der Reduktion von Cytochrom P-450	67
3.3.7.	Sauerstoffaufnahme der Mikrosomen	70
3.3.8.	Wirkung auf den Synergismus von NADPH und NADH	71
3.3.9.	Zur Lokalisierung der Inhibierung durch Tyr_2-Cu^{2+}	74
3.3.9.1.	Inhibierung der Cumolhydroperoxid-abhängigen Hydroxylierung durch Quencher von O_2^-. Die Bildung von O_2^-	76
3.3.9.2.	Hydroxylierung mit einem Oxendonor	81
3.4.	Zur Beteiligung von $OH^{\cdot}$ am Mechanismus der Cytochrom P-450-abhängigen mikrosomalen Hydroxylierung	82
3.4.1.	Inhibierung NADPH-abhängiger Hydroxylierungen an Cytochrom P-450 durch Quencher von $OH^{\cdot}$-Radi-	

		Seite
3.4.2.	Zum Mechanismus der Inhibierung durch $OH^{\bullet}$-Quencher	87
3.4.2.1.	Aktivität der NADPH-Cytochrom c Reduktase in Gegenwart von $OH^{\bullet}$-Quenchern	88
3.4.2.2.	Turnover-Zahl von Cytochrom b_5 in Gegenwart von Methional	9o
3.4.2.3.	Kinetische Untersuchungen zur Inhibition durch $OH^{\bullet}$-Quencher	9o
3.4.2.4.	Sauerstoffaufnahme der Mikrosomen in Gegenwart von $OH^{\bullet}$-Quenchern	93
3.4.2.5.	Bestimmung der Formaldehydbildung	95
3.5.	Zur Beteiligung von O_2^* am Mechanismus der Cytochrom P-450-abhängigen mikrosomalen Hydroxylierung	96
3.6.	Zur Beteiligung aktivierter Sauerstoffspezies am Mechanismus der Cytochrom P-448-abhängigen mikrosomalen Hydroxylierung	97
3.6.1.	Inhibierung der Cytochrom P-448-abhängigen mikrosomalen Hydroxylierung von Benzpyren durch Tyr_2-Cu^{2+} und Cu^{2+}-Komplexe von Aspirinderivaten	99
3.6.2.	Zur Beteiligung von $OH^{\bullet}$ am Mechanismus der Cytochrom P-448-abhängigen mikrosomalen Hydroxylierung	1o3
3.6.3.	Zur Beteiligung von O_2^* am Mechanismus der Cytochrom P-448-abhängigen mikrosomalen Hydroxylierung	1o8

		Seite
4.	Diskussion	1o9
4.1.	Die Natur des "aktiven Sauerstoffs"	11o
4.2.	Hydroxylierung im rekonstituierten mikrosomalen System	115
4.3.	Zur Beteiligung von O_2^- am Hydroxylierungsmechanismus in intakten Phenobarbital-induzierten Mikrosomen	116
4.4.	Zur Beteiligung von OH· am Hydroxylierungsmechanismus	125
4.5.	Zur Beteiligung von O_2^- und OH· am Hydroxylierungsmechanismus in intakten Methylcholanthren-induzierten Mikrosomen	127
4.6.	Zur Beteiligung von O_2^* am mikrosomalen Hydroxylierungsmechanismus	13o
4.7.	Zum Mechanismus der Sauerstoffaktivierung an der terminalen Oxidase und zur Beteiligung von O_2^-	13o
5.	Zusammenfassung	133
6.	Literaturverzeichnis	136
	Lebenslauf	146

Abkürzungen

DABCO	Diaminobicyclooctan
DPF	Diphenylfuran
DPIBF	1,3-Diphenylisobenzofuran
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FMN	Flavin-Mononukleotid
F_p	Flavoprotein
NADH	reduziertes Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
$NADP^+$	oxidiertes Nikotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat
NADPH	reduziertes Nikotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat
P 450	Cytochrom P-450
S	Substrat
SOH	hydroxyliertes Substrat
TKM	150 mM Kaliumphosphat, 50 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, pH 7.75

1. Einführung

1.1. Allgemeine Eigenschaften von Sauerstoff und Sauerstoffreaktionen

Sauerstoff ist eines der häufigsten Elemente der Erde. Der Gesamtanteil an der Erdmasse beträgt 28 Gewichtsprozent. In gebundener Form ist er hauptsächlich in anorganischen Oxiden, Mineralien und Wasser zu finden. Freier molekularer Sauerstoff macht etwa 23 Gewichtsprozent der Atmosphäre aus.
Auf den ersten Blick erscheint es erstaunlich, daß ein so elektronegatives Element in freier Form vorkommen kann; so sind die meisten Reaktionen von Sauerstoff z.B. mit organischen Verbindungen exotherm, da die Bindungsenergie der Sauerstoff-Sauerstoff-Bindung mit ca. 120 kcal/Mol höher ist als die Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung (80 kcal/Mol), Kohlenstoff-Sauerstoff-Bindung (90 kcal/Mol) und Sauerstoff-Wasserstoff-Bindung (110 kcal/Mol). Molekulares Chlor, das ähnlich exotherm mit Kohlenwasserstoffverbindungen reagiert, ist dagegen viel unstabiler.
Der wahrscheinlich wichtigste Grund (1) für diese niedrige Reaktionsfähigkeit von Sauerstoff ist die Tatsache, daß Sauerstoff im Grundzustand als Triplet vorliegt, d.h., er ist ein Biradikal. Im Gegensatz dazu sind Reduktionsprodukte (H_2O und H_2O_2; s. unten) von Sauerstoff und fast alle organischen Verbindungen Singlets, d.h., alle ihre Elektronen sind gepaart. Eine direkte Reaktion eines Triplets mit einem Singlet ist ein "spin-verbotener" Prozess, da die nötige Spin-Inversion viel langsamer (1 sec bis 10^{-9} sec) abläuft als eine

chemische Reaktion (10^{-13}sec).

Molekularer Sauerstoff kann insgesamt 4 Elektronen aufnehmen:

$$O_2 \xrightarrow[H^+]{e^-} O_2H^\cdot \xrightarrow[H^+]{e^-} H_2O_2 \xrightarrow[H^+;-H_2O]{e^-} OH^\cdot \xrightarrow[H^+]{e^-} H_2O \qquad \text{Gl.1}$$

wobei ionisierte Formen der Zwischenstufen möglich sind. Die Zwischenstufen $O_2H^\cdot$ bzw. die ionisierte Form O_2^-, das Superoxidradikal, und H_2O_2 sind in ihren Eigenschaften gut untersucht im Gegensatz zu dem sehr reaktiven und daher sehr instabilen $OH^\cdot$ Radikal (s.unten).

1.1.1. Superoxid Radikale und Dismutation

Die Reduktion von O_2 durch ein Elektron zu $O_2H^\cdot$ bzw. O_2^- verläuft relativ leicht, da in diesem Fall keine Spinrestriktion vorliegt. O_2^- kann experimentell auf verschiedene Weise erzeugt werden: Kathodische Reduktion von Sauerstoff in nichtprotischen Lösungsmitteln und in Wasser, Oxidation von H_2O_2 mit Cerionen, Photolyse oder Ultraschallbehandlung von Wasser, oder mit Hilfe eines Elektronenpulses (2).
Superoxidradikale treten auch in biologischen Systemen auf. Vor fast 20 Jahren berichteten Handler und Fridovich über Untersuchungen am Enzym Xanthinoxidase , die sie veranlassten zu postulieren, daß das Enzym O_2 univalent zu O_2^- reduziert. Es vergingen einige Jahre bis gezeigt werden konnte, daß dies tatsächlich der Fall ist (3). Seit dieser Zeit wurden immer mehr Reaktionen beschrieben, an denen O_2^- beteiligt ist. O_2^- wird gebildet von Xanthinoxidase, Aldehydoxidase, Dihydroorotoxidase, Superoxiddismutase, Flavoproteinen, Eisen-Schwefel-Proteinen, Hämoglobin, Myoglobin,

6-Hydroxydopamin, Hydrochinon, Peroxidasen und Dioxigenasen, in der Atmungskette der Mitochondrien und im Photosystem II der Chloroplasten. Für eine Übersicht s. (2).

Das pK_a des Hydroperoxidradikals ist 4.88 ± o.1 (4), es liegt bei physiologischem pH also nahezu völlig dissoziiert als O_2^- vor. Superoxidradikale können spontan zu H_2O_2 und O_2 dismutieren, wobei die Größe der Reaktionskonstanten vom pH abhängen:

$$HO_2^\cdot + HO_2^\cdot \longrightarrow H_2O_2 + O_2 \qquad k_2 = 7.6 \times 10^5 M^{-1} sec^{-1}$$

$$HO_2^\cdot + O_2^- + H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2 \qquad k_2 = 8.5 \times 10^7 M^{-1} sec^{-1}$$

$$O_2^- + O_2^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2 \qquad k_2 < 10^2 M^{-1} sec^{-1}$$

Der bei der spontanen Dismutation freiwerdende Sauerstoff liegt wahrscheinlich in der Singlet-Form vor (5).

Die Dismutation des Superoxids wird von einer besonderen Klasse von Enzymen, den Superoxiddismutasen, katalysiert. Seit der erstmaligen Beschreibung einer solchen Enzymkatalyse (6) ist eine ganze Anzahl von Enzymen mit Dismutaseaktivität gefunden worden. Sie scheinen ubiquitär in aeroben Organismen vorzukommen (7), und bis auf wenige Ausnahmen (8) in obligat anaeroben Organismen zu fehlen.

Alle bisher beschriebenen Dismutasen enthalten ein oder mehrere Metallatome als redoxaktive Komponente. Kupfer (und Zink) im Enzym, das im Cytosol und im mitochondrialen Intermembranraum von Eukaryonten vorkommt (9). Ein Enzym, das Mangan enthält, kommt in den meisten Bakterien sowie im Matrixraum der Mitochondrien von Eukaryonten vor (10, 11). Weiterhin gibt es ein Enzym, das Eisen enthält und im periplasmatischen Raum von Bakterien vorkommt (12).

Bisher am besten untersucht ist das Enzym aus Rinderblut. Seine Aminosäuresequenz ist bekannt, kristallographische Daten mit einer Auflösung von 3 Å liegen vor, und der Mechanismus der Dismutation von O_2^- ist eingehend untersucht worden (13). Die Reaktionskonstante 2.Ordnung für die Dismutation von O_2^- beträgt etwa

$$k_2 = 2 \times 10^9 \text{ Mol}^{-1} \text{ sec}^{-1}$$

Der bei der enzymkatalysierten Dismutation freiwerdende Sauerstoff liegt in der Tripletform vor.

Außer mit O_2^- reagiert das Kupfer-Zink-Enzym möglicherweise auch noch mit Singlet Sauerstoff (14), der angeregten Sauerstoffspezies, und transformiert ihn zum Tripletzustand.

Die Dismutation des Superoxidradikals wird jedoch nicht nur von Enzymen katalysiert, sondern auch von einer Anzahl niedermolekularer Verbindungen, deren Eigenschaften hier etwas näher beschrieben werden sollen, da sie während der folgenden Untersuchungen eine wichtige Rolle spielen. Direkte spektroskopische Messungen des Verschwindens von O_2^- nach Pulsradiolyse (15) zeigten, daß Komplexe von Aminosäuren mit zweiwertigem Kupfer eine Dismutaseaktivität aufweisen, die mit der des Enzyms vergleichbar ist (Tabelle 1). Das hydratisierte Kupferion in Abwesenheit eines biologischen Chelators wie Rinderserumalbumin zeigte sogar eine doppelt so hohe Aktivität wie das Enzym. Kupfer ist in den Komplexen anscheinend die aktive Redoxkomponente, da Komplexe von Aminosäuren mit Zink keine Aktivität aufweisen. Je nach Wahl der komplexierenden Aminosäuren ist es möglich, hydrophile (z.B. mit Lysin) oder lipophile (z.B. mit Tyrosin) Komplexe zu erhalten.

Tab. 1: Superoxid Dismutaseaktivität einiger niedermolekularer Verbindungen

Verbindung	Reaktionskonstante 2.Ordnung $10^{-9} \times k_{245}$ $M^{-1}sec^{-1}$
Cu^{2+}	2.70
Tyr_2-Cu^{2+}	1.00
$(Gly\text{-}His)_2$-Cu^{2+}	0.29
$(Gly\text{-}His\text{-}Leu)_2$-$Cu^{2+}$	0.21

Die Reaktion der Modellkomplexe ist recht spezifisch. Sie reagieren nicht mit Singlet Sauerstoff (16) oder mit OH· Radikalen (U. Weser, pers. Mitteilung), und als Reaktionsprodukt der Dismutation erscheint H_2O_2 in stöchiometrischen Mengen (M. Younes, pers. Mitteilung).
Das Superoxidradikal ist nicht stabil in wässrigen Lösungen. In Reaktionen mit organischen Verbindungen zeigt es charakteristisches Radikalverhalten, jedoch reagiert es nicht ohne weiteres unter physiologischen Bedingungen mit Alkanen, nichtaktivierten Aromaten, Alkoholen und Aminen.

1.1.2. O_2^- Tests

Das Superoxidradikal kann leicht zu H_2O_2 reduziert werden, oder durch Abgabe eines Elektrons selbst als reduzierendes Agens wirken. Die Reaktionen sind frei reversibel. Dieses Verhalten drückt sich in den verschiedenen halbquantitativen Tests aus, die für O_2^- entwickelt wurden. So reduziert O_2^- Cytochrom c (17), modifiziertes Cytochrom c (18), Tetrani-

tromethan (6) und Nitrobluetetrazolium (19), während es im Adrenalintest (6), bei der Sulfitoxidation (20) und der Reaktion mit Katecholen (21) oxidierend wirkt. Ohne an dieser Stelle näher auf die Vor- und Nachteile der einzelnen Tests einzugehen, soll hier nur erwähnt werden, daß es in biologischen Systemen recht schwierig ist, trotz der Vielzahl der Tests eine wirklich quantitative Bestimmung von O_2^- durchzuführen, da die Spezifität der Tests auf O_2^- nicht in jedem Fall gesichert ist, die Stöchiometrie nicht immer eindeutig ist und die Zusammensetzung der Proben (Schwermetalle, Chelatbildner, Proteingehalt) das Ausmaß der Reaktion von O_2^- mit der Indikatorverbindung beeinflußt.
Eine andere Möglichkeit zur(qualitativen) O_2^-Bestimmung ist die direkte Messung des Elektronenspinresonanz-Signals (22) oder die indirekte Messung über ein sogenanntes Spin-Trap (23).

1.1.3. Zur physiologischen Bedeutung von O_2^-

Wegen seiner Reaktivität zählt O_2^- sicherlich zu den Verbindungen, die zu oxidativen Schäden in der Zelle führen können (Lipidperoxidation, Inaktivierung von Thiolen, Nukleinsäureschäden durch Oxidation von Purinen und Pyrimidinen (24)). Superoxiddismutase würde einen wirksamen Schutz vor dem Auftreten von freiem O_2^- darstellen. Andererseits ist es aber auch möglich, daß erst der bei der Dismutation freiwerdende Singlet Sauerstoff das eigentliche oxidative Agens ist. Zum dritten ist es möglich, daß das Superoxidradikal in manchen Enzymreaktionen eine obligatorische Rolle spielt und Superoxiddismutase nur eine regulatorische Funktion hat.

1.1.4. Wasserstoffperoxid

Nach O_2^- ist Wasserstoffperoxid (H_2O_2) die nächste Reduktionsstufe von molekularem Sauerstoff. Es kann in biologischem Material entweder durch einen gleichzeitigen Zweielektronenübergang auf O_2 oder durch einen Einelektronenübergang aus O_2^- entstehen. Letztere Reaktion ist unter bestimmten Bedingungen sogar reversibel (25), während H_2O_2 normalerweise als Oxidant wirkt. Eine weitere wichtige Möglichkeit der Entstehung von H_2O_2 ist die schon erwähnte (Gleichung 1) Dismutation von $2O_2^-$ zu H_2O_2 und O_2.

H_2O_2 kommt als physiologisches Stoffwechselprodukt bzw. als Substrat vor. Es gibt eine ganze Reihe von Enzymen, die Oxidasen, die im ganzen Tier- und Pflanzenreich zu finden sind und O_2 zu H_2O_2 reduzieren. H_2O_2 spielt bei der Alkoholoxidation in der Leber (26) und bei der Phagozytose (27) eine wichtige Rolle. Etwa 5% des Sauerstoffverbrauchs in der Leber läuft über H_2O_2 (28). Eine wichtige Quelle für H_2O_2 in der Leber ist die Atmungskette der Mitochondrien (29). H_2O_2, das in wässrigen Lösungen stabil ist, wird im Organismus von Katalasen und verschiedenen Peroxidasen abgebaut.

H_2O_2 ist unter physiologischen Bedingungen in der Abwesenheit von Übergangsmetallen als Katalysatoren sehr wenig reaktiv. Es reagiert nur sehr langsam mit Alkanen, Alkenen, Aromaten, Alkoholen und Aminen. Wenn jedoch ein Übergangsmetall in einem niedrigen Valenzzustand vorliegt, kann H_2O_2 als Initiator einer Radikalkettenreaktion wirken.

H_2O_2 kann in biologischen Systemen quantitativ bestimmt werden, in vitro z.B. mit der Scopoletinmethode (30), mit Hilfe von

Cytochrom c Peroxidase (28) und über die Bildung von Katalase Compound I (31). Letztere Methode dient sogar zur Bestimmung von H_2O_2 *in situ* (32).

1.1.5. OH· Radikale

Die dritte Zwischenstufe während der vollständigen Reduktion von Sauerstoff ist das OH·Radikal. Schon bei der schrittweisen Reduktion von O_2 zu O_2^- und H_2O_2 wird die Bindung zwischen den Sauerstoffatomen immer länger (O_2: 1.27 Å, O_2^-: 1.28 Å, H_2O_2: 1.49 Å), und bei Aufnahme des dritten Elektrons wird diese Bindung schließlich gespalten:

$$H_2O_2 \xrightarrow[H^+]{e^-} OH^\cdot + H_2O$$

Diese Reduktion von H_2O_2 ist eine häufige Methode zur Darstellung von OH· Radikalen. Als Reduktionsmittel dienen dabei in biologischen Systemen z.B. O_2^- oder reduzierte Schwermetalle (Gl. 2 und 3):

$$O_2^- + H_2O_2 + H^+ \longrightarrow OH^\cdot + H_2O + O_2 \qquad \text{Gl. 2}$$

$$Fe^{2+} + H_2O_2 + H^+ \longrightarrow OH^\cdot + H_2O + Fe^{3+} \qquad \text{Gl. 3}$$

Eine andere Möglichkeit zur Darstellung von OH· sind Pulsradiolyse (33) und Photolyse von Wasser (34). Diese Methoden finden vor allem in kinetischen Untersuchungen Anwendung. Da OH· aus O_2^- und H_2O_2 entstehen kann, muss mit seinem Auftreten in biologischem Material gerechnet werden. Bisher sind noch keine spezifischen enzymatischen Reaktionen mit OH· Radikalen beobachtet worden und es ist auch schwer vorstellbar, daß ein so reaktives Reagenz wie OH· mit den klassischen

Methoden der Biochemie oder Biophysik überhaupt untersucht werden kann. Nicht auszuschließen ist jedoch, daß $OH^{\cdot}$ membrangebunden oder in einer lipophilen Umgebung durchaus auch physiologisch eine Rolle spielt.

Das $OH^{\cdot}$ Radikal ist, wie schon erwähnt, äußerst reaktiv und zeigt eine sehr geringe Spezifität in seinen Reaktionen. Es reagiert sehr leicht mit organischen Verbindungen wie Alkanen, Alkenen, Aromaten, Alkoholen usw. Der Grund dafür ist in der Tatsache zu suchen, daß $OH^{\cdot}$ leicht ein Wasserstoffatom aus einer organischen Verbindung abziehen kann und diese Reaktion mit 1o bis 25 kcal/Mol exotherm verläuft

$$RH + OH^{\cdot} \longrightarrow R^{\cdot} + OH_2$$

Bisher ist kein direkter Nachweis von $OH^{\cdot}$ in biologischem Material bekannt. Im allgemeinen schließt man auf die Beteiligung dieser Radikale in der zu untersuchenden Reaktion, wenn die betreffende Reaktion durch Zugabe von Verbindungen inhibiert wird, die schnell und relativ spezifisch mit $OH^{\cdot}$ reagieren (Formiat, Benzoat, t-Butanol, Mannit, Dimethoxyäthan, Äthanol, Methional (35 - 41)).

1.1.6. Singlet Sauerstoff, O_2^*

Singlet Sauerstoff entsteht in wässrigen Lösungen hauptsächlich bei der spontanen Dismutation von O_2^- (5), bei der Bestrahlung von Farbstoffen (42) und vielleicht auch während der Lipidperoxidation von ungesättigten Fettsäuren (43). Es wurde verschiedentlich versucht nachzuweisen (14, 44), daß Superoxiddismutase spezifisch mit O_2^* reagiert und ihn in den

Tripletzustand überführt (SOD = "Singlet Oxygen Deconteminase"). Da es jedoch schwierig ist, die Beteiligung anderer Sauerstoffspezies in diesen Tests völlig auszuschließen, und aufgrund der Untersuchungen von Matheson und Mitarbeitern (45) muß die Frage, ob O_2^* ein Substrat für die Superoxiddismutase darstellt, als bisher nicht zufriedenstellend beantwortet angesehen werden.

Singlet Sauerstoff kann in zwei energetisch verschiedenen Formen auftreten, $^1\Delta g$ (22.6 kcal/Mol über dem Grundzustand $^3\sum g^-$), oder $^1\sum g^+$ (37 kcal/Mol über dem Grundzustand $^3\sum g^-$), aus thermodynamischen Gründen (s. Abb. 1) ist in biologischen Systemen jedoch nur mit dem Auftreten der $^1\Delta g$ Spezies zu rechnen.

Ähnlich wie im Fall von $OH^\cdot$ wird die Beteiligung von O_2^* in biologischen Reaktionen mit Hilfe der Inhibition durch eine Verbindung nachgewiesen, die spezifisch mit O_2^* reagiert (DPF, DPIBF, Azid, β-Caroten, DABCO (46 - 50) und andere). Im Falle von DPF kann sogar das Reaktionsprodukt cis-Dibenzoyläthylen identifiziert und semiquantitativ bestimmt werden.

1.2. Reaktionen verschiedener Sauerstoffspezies untereinander

1.2.1. Thermodynamische Gesichtspunkte

Die wegen der Reaktivität und niedrigen steady-state-Konzentration an sich schon schwierige Bestimmung von angeregten Sauerstoffspezies wird dadurch noch erschwert, daß diese Spezies zum Teil auch noch untereinander reagieren können. Im folgenden sollen einige solche Reaktionen zusammengestellt werden,

und mit Hilfe eines Oxidationszustandsdiagramms (Abb. 1) soll gezeigt werden, welche Reaktionen thermodynamisch möglich sind. In diesem Diagramm ist die freie Energie pro Sauerstoffatom bei pH 7 ($\Delta G_o'$) gegen die formale Ladung des Sauerstoffatoms (n) aufgetragen. Auf der linken Ordinate ist nE_o' aufgetragen, wobei gilt $\Delta G_o' = nF\Delta E_o'$ (F = Faraday'sche Konstante). Die Steigung der Verbindungslinien zwischen den einzelnen Sauerstoffspezies stellt das Reduktionspotential des jeweiligen Redoxpaares dar.

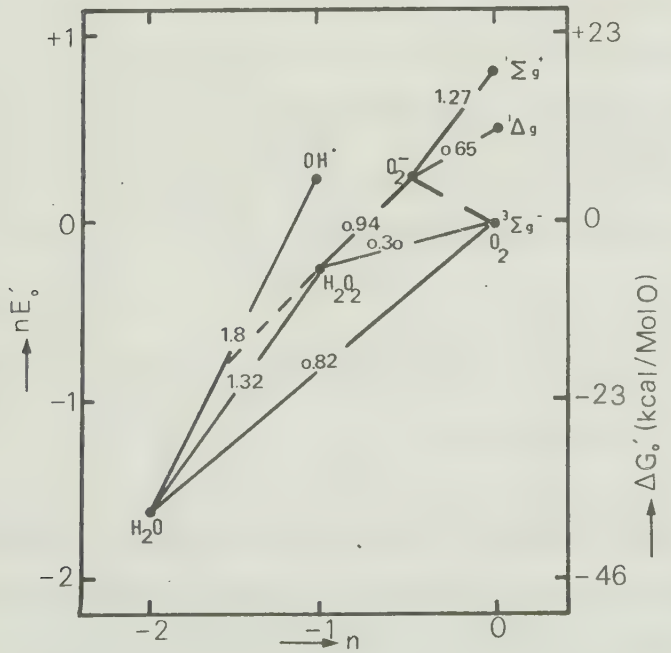


Abb. 1: Oxidationszustandsdiagramm von Sauerstoff bei pH 7. Erläuterung siehe Text.

Die spontane Reaktion (Gl. 4)

$$2O_2^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2 \qquad \text{Gl. 4}$$

besitzt ein $\Delta G_o'$ von 29.o kcal, wenn der freiwerdende Sauerstoff als Triplet $^3\Sigma g^-$ freiwird, -6.4 kcal oder +7.6, wenn der Sauerstoff als Singlet $^1\Delta g$ bzw. $^1\Sigma g^+$ freiwird, d.h., die spontane Dismutation von O_2^- kann $^1\Delta g O_2$ bilden, nicht jedoch $^1\Sigma g^+$ O_2 (positives $\Delta G_o'$).

Läuft die Reaktion enzymkatalysiert ab, so kann nur Triplet O_2 $^3\Sigma g^-$ freiwerden: Die Reaktion läuft nach folgendem Mechanismus (13) ab:

$$\text{SOD} - Cu^{2+} + O_2^- \longrightarrow \text{SOD} - Cu^+ + O_2 \qquad \text{Gl. 5}$$

$$\text{SOD} - Cu^+ + O_2^- \xrightarrow{2\,H^+} \text{SOD} - Cu^{2+} + H_2O_2 \qquad \text{Gl. 6}$$

Das Reduktionspotential des Paares SOD-Cu^{2+}/SOD -Cu^+ (o.42 Volt) ist zu niedrig, um O_2^- zu $^1\Delta g$ O_2 zu oxidieren. Dazu wäre ein Redoxpotential von mindestens +o.65 Volt nötig.

Für den sogenannten Haber-Weiss-Zyklus (51), Gl. 7 und 8

$$O_2^- + H_2O_2 + H^+ \longrightarrow OH^\cdot + H_2O + O_2 \qquad \text{Gl. 7}$$

$$OH^\cdot + H_2O_2 \longrightarrow O_2^- + H_2O + H^+ \qquad \text{Gl. 8}$$

kann analog gezeigt werden, daß die Bildung von $^1\Delta g$ O_2 mit $\Delta G_o' = -3.5$ kcal möglich ist.

Wie aus dem Diagramm ersichtlich ist, laufen einige Redoxvorgänge stark exotherm ab. In der Natur gibt es nun eine Reihe von Enzymen, die an solchen Redoxvorgängen beteiligt sind. Teilweise wird die bei den Reaktionen freiwerdende Energie in chemische Energie umgewandelt (oxidative Phosphorylierung in Mitochondrien, Chloroplasten und Bakterien), in anderen Fällen werden die energiereichen Sauerstoffspezies im Inter-

mediärstoffwechsel verwendet oder anscheinend nur unschädlich gemacht (Katalasen, Peroxidasen). Eine dritte Klasse von Enzymen, die Oxigenasen, sind dagegen in der Lage, einen Teil der bei der Reduktion von Sauerstoff freiwerdenden Energie dazu zu benutzen, den aktivierten Sauerstoff in ein organisches Molekül einzuführen.

1.3. Eigenschaften und Funktionen von Oxygenasen

1.3.1. Klassifikation und allgemeine Eigenschaften

Enzyme, die eine Reaktion katalysieren, während der molekularer Sauerstoff als unmittelbarer Elektronenakzeptor dient, werden "Oxidasen" genannt, die formal in drei Kategorien aufgeteilt werden können. Die erste Kategorie von Enzymen überträgt ein Elektron auf molekularen Sauerstoff unter der Bildung von O_2^- (Beispiel: Xanthinoxidase):

$$XH + O_2 \longrightarrow X + O_2^- + H^+$$

In der zweiten Gruppe werden zwei Elektronen auf molekularen Sauerstoff übertragen, wobei H_2O_2 gebildet wird (Beispiel: Glucose Oxidase):

$$XH_2 + O_2 \longrightarrow X + H_2O_2$$

Enzyme der dritten Gruppe katalysieren die Übertragung von Elektronen auf molekularen Sauerstoff unter Bildung von Wasser. Gewöhnlich werden dabei vier Elektronen zur Bildung von zwei Molekülen Wasser verbraucht (Beispiel: Cytochrom Oxidase):

$$XH_4 + O_2 \longrightarrow X + 2H_2O$$

Diese drei Kategorien stellen formal eine besondere Klasse von Enzymen dar, die "Oxygenasen" genannt werden. Darunter versteht

man eine Gruppe von Enzymen, die molekularen Sauerstoff aktiviert und im folgenden ein oder zwei Atome Sauerstoff in ein Substrakt einführt:

$$X + O_2 \longrightarrow XO_2 \qquad \text{Gl. 9}$$

$$X + 1/2\ O_2 \longrightarrow XO \qquad \text{Gl. 10}$$

Die formale Reaktion Gl. 10 läuft in Wirklichkeit so ab, daß ausgehend von molekularem Sauerstoff ein Atom in das Substratmolekül X eingeführt wird und das andere in Gegenwart eines geeigneten Elektronendonators DH_2 zu Wasser reduziert wird:

$$X + O_2 + DH_2 \longrightarrow XO + H_2O + D \qquad \text{Gl. 11}$$

Die Besonderheit der beiden Reaktionen Gl. 9 und Gl. 10 besteht darin, daß hier eine Aktivierung und anschließend eine "Sauerstoffixierung" in einem organischen Molekül stattfindet, während in den drei anderen Reaktionen Wasserstoffatome als Akzeptoren dienen. Reaktion Gl. 9 wird von sogenannten "Dioxygenasen" katalysiert, während man im Falle von Gl. 11 von "Monoxygenasen" oder auch "mischfunktionellen Oxidasen" spricht, da hier ein Sauerstoffatom in das Substrat eingeführt wird und das andere Wasser bildet. Teilweise wird auch die Bezeichnung "Hydroxylase" für diese Art von Enzymen gebraucht. Werden die Reduktionsäquivalente vom Substrat geliefert, so spricht man von "internen Monoxygenase"; unter "externen Monoxygenasen" versteht man solche Monoxygenasen, die einen Elektronendonor benötigen, der nicht das Substrat ist. Dieser Elektronendonor dient als Basis für die Subklassifizierung der externen Monoxygenasen.

Tabelle 2 zeigt eine Zusammenstellung der bisher bekannten Oxygenasen.

Tab. 2: Zusammenstellung bisher bekannter Oxygenasen

Oxygenase	EC-Nummer
A. Dioxygenase	
1. Intramolekulare Dioxygenase	1.13.11
a. Hämprotein	
b. Eisenschwefelprotein	
c. Kupferprotein	
2. Intermolekulare Dioxygenase	1.14.11
3. Verschiedene	1.13.99
B. Monoxygenase	
1. Interne Monoxygenase	1.13.12
2. Externe Monoxygenase	1.14
a. Pyridinnucleotid-verbundenes Flavoprotein	1.14.13
b. Flavin-verbundenes Hämprotein	1.14.14
c. Eisenschwefelprotein-verbundenes Hämprotein	1.14.15
d. Pteridin-verbundene Monoxygenase	1.14.16
e. Ascorbat-verbundenes Kupferprotein	1.14.17
f. Mit anderem Reduktant als Substrat	1.14.18

Typische Reaktionen, die von Monoxygenasen katalysiert werden sind:

1. Hydroxylierung einer CH-Bindung am gesättigten C-Atom
2. Dealkylierung an Heteroatomen
3. Hydroxylierung von Aromaten an Positionen mit hoher Elektronendichte
4. Epoxidierung von Doppelbindungen

Dabei ist die Primärreaktion in allen Fällen die Einführung von Sauerstoff in das Substrat.

1.3.2. Biologische Funktion von Oxygenasen

Die Bedeutung der biologischen Sauerstoffixierung ist in den letzten Jahren immer offensichtlicher geworden. Oxygenasereaktionen sind beteiligt an der Biosynthese, Transformation und Degredation von Aminosäuren, Lipiden, Zuckern, Porphyrinen, Vitaminen und Hormonen. Daneben sind sie von entscheidender Bedeutung im Stoffwechsel von Arzneimitteln, Insektiziden und cancerogenen Verbindungen. Damit spielen sie eine wichtige Rolle in der Medizin, Landwirtschaft, Mikrobiologie, Nahrungsmitteltechnologie und Gesundheitswesen. Die Bedeutung der Monoxygenasen wird durch die Tatsache dokumentiert, daß kein anderer biochemischer Mechanismus bekannt ist, bei dem eine nichtaktivierte CH-Bindung angegriffen wird.

Die meisten Monoxygenasen katalysieren die Hydroxylierung von aromatischen und aliphatischen Verbindungen. Diese primäre Reaktion, die Einführung des Sauerstoffatoms, kann zu Folgereaktionen führen wie Epoxidformation, Dealkylierung, Decarboxylierung, Deaminierung und Bildung von Stickstoff- oder Schwefeloxiden. Die Hydroxylierung und auch die evtl. auftretenden Folgereaktionen führen dazu, daß das entstehende Produkt polarer, d.h. wasserlöslicher wird. Die Einführung einer Hydroxylgruppe ist für den Stoffwechsel der meisten lipophilen Substanzen äußerst wichtig, da diese dadurch wasserlöslicher werden und in dieser Form oder nach Kupplung an eine andere polare Verbindung leichter ausgeschieden werden können.
Im folgenden soll eine besondere Klasse von Monoxygenasen beschrieben werden, die Haem-enthaltenden Monoxygenasen, und hier insbesondere die Monoxygenasen der Lebermikrosomen.

1.4. Eigenschaften von Lebermikrosomen und mikrosomalen Monoxygenasen

Unter Mikrosomen versteht man eine bestimmte Zellfraktion, die operational definiert ist: Bei der differentiellen Zellfraktionierung durch Zentrifugation erhält man sie als postmitochondrialen 100 000 x g - Niederschlag. Mikrosomen werden in Form von Vesikeln isoliert, die sich während des Fraktionierungsvorgangs aus dem Membransystem des Glatten und Rauhen Endoplasmatischen Retikulums bilden. In vivo und in vitro können viele enzymatische Reaktionen in den Mikrosomen ablaufen. Wichtig sind die Proteinbiosynthese im Rauhen und der Lipidstoffwechsel im Glatten Endoplasmatischen Retikulum.
Quantitativ ist das Endoplasmatische Retikulum die wichtigste Zellfraktion der Leber. Normalerweise sind in einem Gramm Leber 40 bis 50 Milligramm mikrosomales Protein enthalten, und nach Induktion (s. unten) kann es bis zu 20% des Gesamtleberproteins betragen.
Neben Proteinbiosynthese und Lipidstoffwechsel läuft als wichtige enzymatische Reaktion in den Mikrosomen die Monoxygenasereaktion ab, deren Komponenten im folgenden beschrieben werden.

1.4.1. Cytochrom P-450 und P-448

1958 beschrieben Klingenberg (52) und Garfinkel (53) unabhängig voneinander ein Kohlenmonoxid-bindendes Pigment in der Säugetierleber. Dieses Pigment bindet nur in der reduzierten Form CO und zeigt dann ein scharfes Absorptionsmaximum bei

450 nm. Einen direkten Hinweis für die Teilnahme dieses Pigments an der Monoxygenierungsreaktion in Lebermikrosomen war die Demonstration eines photochemischen Aktionsspektrums einer Monoxygenasereaktion, die durch CO inhibiert worden war (54). Die ersten grundlegenden Studien an diesem Pigment waren schon früher von Omura und Sato (55, 56) durchgeführt worden, die versuchten, das CO-bindende Pigment zu isolieren. Dabei stellten sie fest, daß die charakteristische Bande bei 450 nm während der Isolation unter gleichzeitiger Inaktivierung des Enzyms zu 420 nm verschoben wurde und nannten diese Form "Cytochrom P-420". Dieses Cytochrom zeigt spektrale Charakteristika eines b-Cytochroms. Da die Transformation von 450 nm nach 420 nm quantitativ verlief, konnte ein Extinktionskoeffizient von ε = 91 mM^{-1} für das Cytochrom bestimmt werden.

Der Gehalt der Mikrosomen an Cytochrom P-450 und die Monoxygenaseaktivität läßt sich durch <u>in vivo-</u> Verabreichung bestimmter Stoffe innerhalb von wenigen Tagen bis auf das Vierfache erhöhen (57). Diese "Induktion " ist gut untersucht und dient u.a. als Modell für eine Membranbiosynthese. Je nach Art des Induktionsmittels wird die Bildung von Cytochromen bewirkt, die sich mehr oder weniger in ihren molekularen Eigenschaften und vielleicht auch Substratspezifitäten unterscheiden. Vor einigen Jahren gelang es der Gruppe um Coon (58, 59), mit Hilfe von Desoxycholat oder nicht-ionischen Detergenzien in Glycerin-Puffer intaktes Cytochrom P-450 zu isolieren. Molekulargewichtsbestimmungen des Cytochroms, wie es von Coon isoliert worden war, ergaben einen Wert von etwa 350 000 Dalton. Gelelektrophorese in Gegenwart von SDS und Mercaptoäthanol

zeigten verschiedene Banden, die einem Molekulargewicht von 53 000 bis 55 000 Dalton entsprechen. Eingehendere Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, daß je nach Tierart, Geschlecht und Vorbehandlung 5 bis 6 Banden nach der Gelelektrophorese des isolierten Cytochrom P-450 zu finden sind. Nach Induktion der Tiere mit polycyclischen Kohlenwasserstoffen wie Benzpyren oder Methylcholanthren erscheint nach Reduktion der Mikrosomen in Gegenwart von CO ein Absorptionsmaximum bei 448 nm (60). Das diesem Cytochrom zugehörige Protein wird Cytochrom P_1450 oder Cytochrom P-448 genannt.
Die Untersuchungen von Omura und Sato (55, 56) und Ichikawa und Yamano (61, 62) zeigten, daß das CO-bindende Pigment ein Haemprotein ist. Untersuchungen des Effekts von Polyolen und Glutathion an der Transformation des Peakmaximums von 450 nach 420 nm führten zu dem Schluß, daß das Cytochrom ein Lipoprotein ist und daß die Transformation durch eine Dissoziation zwischen Haemprotein und den Lipiden der mikrosomalen Lipide bewirkt wird.

Bisher ist wenig über die molekularen Eigenschaften des Cytochroms bekannt, das aus Lebermikrosomen isoliert worden ist. Die wichtigsten Informationen über den Elektronentransport und die Rolle von Cytochrom P-450 sind daher aus spektroskopischen Studien, wie sie von B. Chance entwickelt wurden, am membrangebundenen System in Mikrosomen *in situ* erhalten worden. Eingehende mechanistische Studien (63) sind dagegen an einem ähnlichen Cytochrom, das aus dem Bakterium *Pseudomonas putida* isoliert wurde (Cytochrom $P\text{-}450_{cam}$), von Gunsalus und Mitarbeitern durchgeführt worden, da dieses Enzym nicht membrangebunden ist und daher leichter untersucht werden kann.

1.4.2. NADPH→Cytochrom P-450-Reduktase

Während des Ablaufs der Monoxygenasereaktion werden Reduktionsäquivalente von NADPH auf Cytochrom P-450 übertragen. Dieser Redoxvorgang wird von einem Flavoprotein, NADPH-Cytochrom P-450-Reduktase, katalysiert, das höchstwahrscheinlich mit dem schon seit 1950 bekannten Enzym NADPH-Cytochrom c-Reduktase identisch ist (64). NADPH-Cytochrom P-450-Reduktase der Lebermikrosomen ist von verschiedenen Arbeitsgruppen isoliert und detailiert untersucht worden. Das Molekulargewicht beträgt 81 000 Dalton. Das gereinigte Enzym enthält 1 FMN und 1 FAD und reduziert eine Vielzahl von Ein- und Zweielektronenakzeptoren (z.B. Cytochrom c, Ferricyanid, 2,6-Dichlorphenolindophenol, Nitrobluetetrazolium, molekularen Sauerstoff, Menadion). Während des Elektronentransports ist das Enzym entweder halb reduziert (freies Radikal) oder voll reduziert.

NADPH-Cytochrom P-450-Reduktase katalysiert auch die Reduktion von Fe^{3+} zu Fe^{2+} in Gegenwart von Eisenchelatoren (65). Diese Reaktion ähnelt der Peroxidation mikrosomaler Lipide (66). In Gegenwart von extrahierten mikrosomalen Lipiden und einer Kombination von NADPH, NADPH-Cytochrom P-450-Reduktase und Fe^{3+} komplexiert mit EDTA findet Peroxidation statt. In diesem Fall wirkt das Fe^{3+}-Ion nicht nur als einfacher Elektronenakzeptor, sondern auch als Aktivator von Sauerstoff (66, 67). An dieser Reaktion sind Superoxidradikale beteiligt, wie mit Hilfe von Superoxiddismutase gezeigt werden konnte. Von verschiedenen anderen Arbeitsgruppen wurde demonstriert, daß das Enzym auch *in situ* mit Sauerstoff unter Bildung von O_2^- reagiert.

1.4.3. NADH-Cytochrom b_5-Reduktase

Das NADH-abhängige mikrosomale Elektronentransportsystem, NADH-Cytochrom b_5-Reduktase und Cytochrom b_5, ist schon früh eingehend untersucht worden (68, 69), lange bevor etwas über seine mögliche funktionelle Bedeutung bekannt wurde. Das Enzym (Molekulargewicht 44 000 Dalton) und das Akzeptorsubstrat Cytochrom b_5 sind amphipatische Proteine, d.h., sie besitzen einen ausgeprägt hydrophoben und hydrophilen Teil. Der hydrophobe Teil verankert das Protein durch nichtkovalente Wechselwirkung in der Lipidphase der Mikrosomenmembran; der hydrophile Teil, der auch die aktiven Zentren FAD und Haem enthält, ragt in das umgebende Cytosol. Das Enzym ist mit Sicherheit an der Desaturierung von Fettsäuren beteiligt (70). Seine Rolle während der mikrosomalen Hydroxylierung ist noch nicht völlig geklärt (s.unten).

1.4.4. Phospholipidgehalt des P-450-Systems

Die Wichtigkeit hydrophober Wechselwirkung zwischen Cytochrom P-450 und der mikrosomalen Membran war schon durch die grundlegenden Studien von Omura und Sato und Ichikawa und Yamano dargelegt worden. Die Arbeiten von Coon und Mitarbeitern am rekonstituierten System (58, 59) zeigten schließlich, daß eine hitzestabile Komponente niedrigen Molkulargewichts essentiell für die enzymatische Aktivität ist. Diese Komponente wurde als Phosphatidylcholin identifiziert (71).

1.4.5. Faktor X

Estabrook (72) postulierte aufgrund eigener Arbeiten und aufgrund von Ergebnissen von Dallner, Siekevitz und Pallade (73) das Vorhandensein einer unbekannten Komponente in den Mikrosomen, die Faktor X genannt wurde. Es war gefunden worden, daß in foetalen Mikrosomen die Gegenwart von NADPH-Cytochrom P-450-Reduktase und die Cytochrome P-450 und b_5 nicht für die Funktion des mikrosomalen Elektronentransports ausreicht. Möglicherweise ist dieser Faktor X ein Eisen-Schwefel-Protein (74) oder eine Selen-haltige Komponente (75).

1.4.6. Möglicher Synergismus zwischen NADPH-Cytochrom P-450-Reduktase und NADH-Cytochrom b_5-Reduktase

1971 wurde eine Wechselwirkung zwischen NADPH-Cytochrom P-450-Reduktase und Cytochrom b_5 festgestellt (76). Zugabe von NADH zu Mikrosomen stimulierte NADPH-abhängige Hydroxylierung mehr als additiv. Dieser Befund führte zu der Annahme, daß eines der beiden Elektronen, die von Cytochrom P-450 benötigt werden, von NADH via NADH-Cytochrom b_5-Reduktase und Cytochrom b_5 geliefert wird. Unklar ist dabei die Rolle von NADPH-Cytochrom P-450-Reduktase, da auch dieses Enzym Cytochrom b_5 reduzieren kann. Die Stimulierung der Hydroxylierung durch NADH scheint zweifach begründet zu sein:

1. Die Gegenwart von NADH verhindert durch Reduktion von Cytochrom b_5 einen Transfer von Elektronen durch NADPH-Cytochrom P-450-Reduktase auf Cytochrom b_5, sodaß alle

Reduktionsäquivalente auf Cytochrom P-450 übertragen werden können.

2. NADH dient ebenfalls als Reduktionsmittel von Cytochrom P-450 (77). Dies konnte für den Stoffwechsel von Benzpyren gezeigt werden (78).

Möglicherweise spielt NADH als Elektronendonor auch eine Rolle in "entkoppelten" Mikrosomen (79).

Die physiologische Bedeutung dieser Wechselbeziehung zwischen den beiden Flavoproteinen und ihren Akzeptoren ist unklar. Abb. 2 zeigt mögliche Reaktionswege zwischen den Komponenten. Diese Abbildung ist allerdings sehr schematisch, da die stöchiometrischen Verhältnisse der Komponenten nicht berücksicht sind.

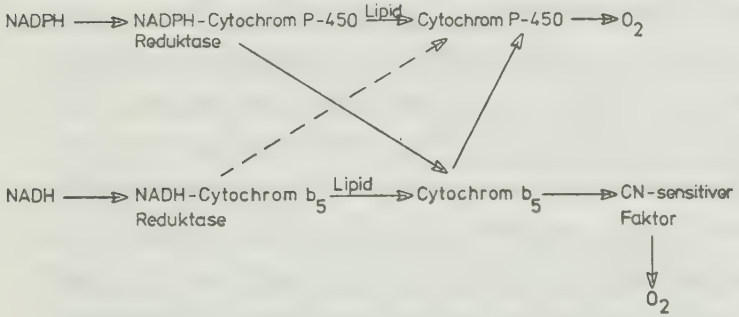


Abb. 2: Wechselbeziehung der mikrosomalen Komponenten

1.4.7. Stöchiometrie und Topologie in der Membran

In Lebermikrosomen befinden sich 10 bis 20 Moleküle Cytochrom P-450 und 3 Cytochrome b_5 pro Flavoprotein (80). Erste Untersuchungen über die Anordnung der Komponenten durch Estabrook (81) mit Hilfe des SH-Reagenz Mersalyl führten zu dem Schluß, daß in der mikrosomalen Membran ein rigides Mehrkomponentensystem vorliegt, in dem mehrere Moleküle Cytochrom P-450 ein Flavoprotein umgeben ("clusterlike arrangement"), und daß Reduktionsäquivalente nur innerhalb eines solchen einzelnen Komplexes übertragen werden können, ein Elektronentransfer zwischen Komponenten verschiedener Komplexe also nicht stattfindet. Da es schwer vorstellbar ist, wie die Reduktase (Molekulargewicht etwa 80 000) in der Membran fest mit 10 bis 20 Molekülen Cytochrom P-450 verbunden sein und wirkungsvoll mit ihnen reagieren kann, wurde die Richtigkeit dieser Vorstellung vielfach angezweifelt. Ebenfalls mit Hilfe von Mersalyl konnte Yang zeigen (82), daß wahrscheinlich eine laterale Mobilität einer oder mehrerer Komponenten vorliegt. Eine neue Veröffentlichung der Estabrook-Gruppe untersucht den biphasischen Verlauf der Reduktion von Cytochrom P-450 durch die Reduktase (83) und kommt zu dem Schluß, daß die schnelle Phase der Reduktion dem Vorgang im Komplex entspricht, während die langsame Phase die Reduktion jener Moleküle darstellt, die nicht direkt mit dem Komplex verbunden sind und erst durch laterale Diffusion erreicht werden. Dieser Interpretation widersprechen Daten, wie sie unter 3.3.9.1. in dieser Arbeit aufgeführt sind.

Eine dritte Möglichkeit der Interpretation, die jedoch bisher noch nicht in der Literatur diskutiert worden ist, besteht darin, daß die reduzierte Sauerstoffspezies O_2^-, die vom Flavoprotein gebildet wird, als mobiler Träger für Elektronen dient, ähnlich wie Ubichinon in der Mitochondrienmembran (84).

1.5. Vorstellungen zum Mechanismus der Monoxygenase-Reaktion in Lebermikrosomen

Die Untersuchungen zum Mechanismus der Cytochrom P-450-abhängigen Hydroxylierung wurden dadurch erleichtert, daß es schon recht früh möglich war, bakterielles Cytochrom P-450 zu isolieren, zu reinigen und seine Reaktion in einem membranfreien System zu untersuchen. 1967 schlug Estabrook ein hypothetisches Reaktionsschema vor, das in Abb. 3 dargestellt ist und aus sechs Reaktionsschritten besteht:

1. Reversible Wechselwirkung eines Substrats mit der Fe^{3+}-Form des Cytochrom P-450, dabei Übergang von der low spin- zur high spin-Form und Ansteigen des Redoxpotentials des Cytochroms
2. Ein-Elektronen-Reduktion zum Fe^{2+}-Substrat Komplex
3. Reversible Wechselwirkung von Sauerstoff mit dem Fe^{2+}-Substrat Komplex zu einem oxygenierten Fe^{2+}-Substrat Komplex
4. Ein-Elektronen-Reduktion zu einer nicht näher definierten Zwischenstufe, etwa einer Superoxid-Fe^{2+}-Substrat Zwischenstufe, wie in Abb. 3 dargestellt, oder einem Hydroperoxyd-Fe^{3+}-Substrat Komplex
5. Interner Redoxprozess, wobei ein Atom des molekularen Sauerstoffs in das Substrat als Hydroxylgruppe eingeführt und

das andere Atom zu Wasser reduziert wird

6. Dissoziation des hydroxylierten Produkts von der Fe^{3+}-Form des Cytochroms und Regeneration der low spin-Form von P-450

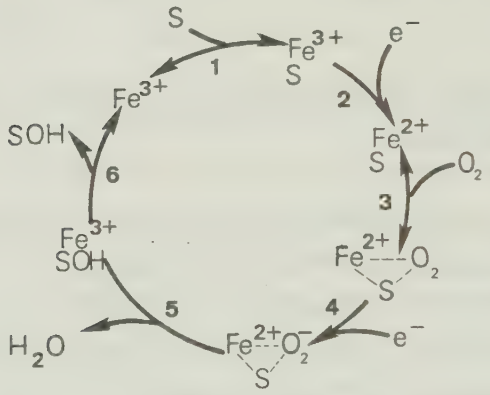


Abb. 3: Postulierter Reaktionsmechanismus für die zyklische Reduktion und Oxidation von Cytochrom P-450 während der Sauerstoffaktivierung und Substrathydroxylierung.

Dieses allgemeine Schema wurde sowohl für die bakterielle als auch die mikrosomale Form von Cytochrom P-450 vorgeschlagen. Dabei dürfen die Schritte 1 bis 3 als experimentell gesichert gelten, während über die Schritte 4 und 5 im membrangebundenen mikrosomalen P-450 bisher noch keine experimentellen Unterlagen vorhanden waren. Besonders die Beteiligung von O_2^- muß als reine Spekulation gewertet werden. Es war nämlich verschiedentlich erfolglos versucht worden, die Beteiligung von O_2^- am Hydroxylierungsprozess in Lebermikrosomen über eine Inhibierung durch Superoxiddismutase nachzuweisen.

Abb. 4 zeigt in einem hypothetischen Reaktionsschema, modifiziert nach Estabrook und Mitarbeitern, die Beteiligung der beiden Flavoproteine am Elektronentransfer während des Redoxvorganges am Cytochrom P-450. NADPH-Cytochrom P-450-Reduktase liefert das erste Elektron und NADH-Cytochrom b_5-Reduktase das zweite. Auch in diesem Schema sind die Schritte bis zur Bildung des ersten ternären Komplexes aus Cytochrom P-450, Substrat und Sauerstoff gesichert, während die Aktivierung des Sauerstoffs, soweit sie in diesem Schema überhaupt dargestellt ist spekulativ ist.

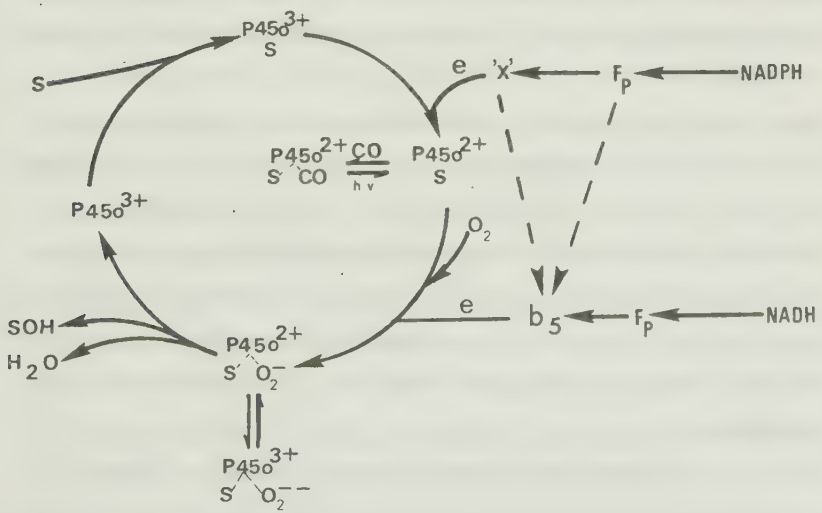


Abb. 4: Wechselwirkung der an der mikrosomalen Hydroxylierung beteiligten Komponenten und hypothetischer Reaktionsmechanismus der Sauerstoffaktivierung und Substrathydroxylierung, modifiziert nach Estabrook (124).

1.6. Mechanismus der Hydroxylierung in einem rekonstituierten mikrosomalen Enzymsystem der Leber

Ein wichtiger Beitrag zum Verständnis des Reaktionsmechanismus der Hydroxylierung in der Leber gelang 1971 Coon und Mitarbeitern (85): Sie konnten die für die Hydroxylierung notwendigen Komponenten der Lebermikrosomen trennen und unter Erhalt der enzymatischen Aktivität wieder rekonstituieren. Die drei Komponenten sind Cytochrom P-450, NADPH-Cytochrom P-450-Reduktase und Phosphatidylcholin.

Coon untersuchte in diesem rekonstituierten System, ob O_2^- eine aktive Form von Sauerstoff in der P-450-katalysierten Hydroxylierung darstellt. Es konnte gezeigt werden, daß Superoxiddismutase eine signifikante Inhibierung der Hydroxylierung bewirkte; eine vollständige Inhibierung wurde jedoch nur erreicht in Gegenwart von Salzkonzentrationen, die selbst ein wenig inhibierten. Darüberhinaus war es möglich, in Abwesenheit von NADPH-Cytochrom P-450-Reduktase zu hydroxylieren, wenn dieses Enzym durch Xanthin und Xanthinoxidase ersetzt wurde, d.h. durch einen Generator von O_2^-. Auch in diesem Falle wurde die Hydroxylierung durch Superoxiddismutase inhibiert.

Aus diesen Befunden wurde geschlossen, daß O_2^- in diesem rekonstituierten System eine wichtige Rolle während der P-450-katalysierten Hydroxylierung spielt. Unklar blieb, ob O_2^- die aktivierte Sauerstoffspezies selbst ist oder einen Vorläufer für $OH^\cdot$ oder Singlet Sauerstoff darstellt, und ob O_2^- auch in intakten mikrosomalen Membranen an der Hydroxylierung beteiligt ist.

1.7. Modellreaktionen zur Beteiligung von aktivierten Sauerstoffspezies an Hydroxylierungen

1.7.1. Allgemeine Gesichtspunkte der Fixierung von Sauerstoff

Alle Reaktionen von O_2, die von Monoxygenasen katalysiert werden, sind exotherm. Aus diesem Grund sind sie im allgemeinen nicht reversibel. Wie bereits unter 1.1. dargestellt, besitzt O_2 jedoch eine sehr niedrige kinetische Aktivität, da er im Grundzustand ein Triplet ist und als solches wegen des Spin-Verbots nicht mit den üblichen Substraten der Monoxygenasen reagieren kann. Wie gelingt es nun Monoxygenasen, organische Verbindungen mit dem kinetisch trägen Sauerstoff reagieren zu lassen?

Eine Möglichkeit bestünde darin, daß die reaktive Form von Sauerstoff der angeregte Singlet-Zustand ist. Aus der organischen Chemie sind Reaktionen analog denen, die von Monoxygenasen katalysiert werden, bekannt. Es wäre denkbar, daß sich Singlet Sauerstoff trotz der hohen Energiebarriere von 22 kcal durch Dismutation von zwei O_2^- bildete.

Eine andere Möglichkeit wäre, daß Triplet-Sauerstoff sich an ein Übergangsmetall bindet, das selbst ungepaarte Elektronen besitzt, im Falle der Lebermikrosomen also Eisen. In einem solchen Komplex überlappen die Elektronenorbitale des Sauerstoffs mit denen des Metalls und können nun dem Gesamtkomplex zugeordnet werden. Es ist ein spin-erlaubter Vorgang, wenn ein solcher Komplex mit einem organischen Singlet-Substrat zu einem oxidierten Singlet-Produkt reagiert, falls die Zahl der

ungepaarten Elektronen im Gesamtkomplex während der Reaktion konstant bleibt. In einer solchen Reaktion reagiert O_2 nicht als Singlet, sondern nach einem ionischen, nicht-radikalischen Mechanismus, da er mit dem Übergangsmetall komplexiert ist. Auch für diesen Mechanismus gibt es chemische Modellreaktionen, und möglicherweise ist er auch in enzymatischen Reaktionen zu finden (86 - 88).

Eine dritte Möglichkeit des Mechanismus wäre die Reaktion des Sauerstoffs als freies Radikal. So ist es spin-erlaubt, wenn ein Triplet mit einem Singlet reagiert und zwei Duplets, also zwei freie Radikale, bildet, und diese beiden Duplets unter Bildung eines Singlet-Produkts miteinander reagieren. Dieser Mechanismus läuft etwa bei der Reaktion eines vollreduzierten Flavins mit O_2 ab (89):

$$FH_2 + O_2 \longrightarrow FH^{\cdot} + O_2^{-} \longrightarrow F + H_2O_2$$

Hier reagiert ein Singlet (FH_2) mit Triplet O_2 unter Bildung eines Singlet-Produkts. Ganz allgemein reagiert Sauerstoff also in diesem Mechanismus mit einem Kofaktor nach einem Radikalmechanismus, und es ist das reaktive Produkt der Kofaktor-Sauerstoff-Reaktion, das das Substrat oxidiert.

1.7.2. Modelle zur möglichen Natur des angeregten Sauerstoffs

Eingehende Untersuchungen an Modellreaktionen zur enzymatischen Aktivierung von Sauerstoff haben zu der Annahme geführt, daß das aktive Reagens eine elektrophile Sauerstoffspezies ist. In (90) findet man eine Zusammenstellung der wichtigsten Modellreaktionen. Da in der Gesamtreaktion Sauerstoff reduziert

wird, wurde die Rolle verschiedener Zwischenstufen der Sauerstoffreduktion im Hydroxylierungsmechanismus untersucht. O_2^- reagiert in Modellreaktionen bei physiologischen Reaktionen nur träge mit Alkanen, Alkenen, nichtaktivierten Aromaten, Alkoholen und Aminen (91). Deswegen wurde angenommen, daß O_2^- während der mikrosomalen Hydroxylierung wahrscheinlich, falls es tatsächlich an der Reaktion beteiligt sein sollte, nicht direkt mit dem Substrat reagiert. Es sind aber auch Fälle bekannt, in denen O_2^- wahrscheinlich direkt mit einem Substrat reagiert (92, 93).
Auch H_2O_2 reagiert in Modellreaktionen mit typischen Hydroxylase-Substraten nur sehr träge (78).
Das OH$^\cdot$ Radikal ist zweifellos eine sehr reaktive Zwischenstufe der Sauerstoffreduktion und reagiert leicht mit typischen Hydroxylase-Substraten. Wegen der hohen Reaktivität ist es jedoch sehr wenig selektiv. Außerdem ist die Stöchiometrie der enzymatischen Reaktion oft nicht mit der Annahme von OH$^\cdot$ als alleiniger aktivierter Sauerstoffspezies in Einklang zu bringen. In Modellreaktionen wurde jedoch eine Beteiligung am Hydroxylierungsmechanismus gezeigt (94, 95).

Es wurde wiederholt vorgeschlagen, daß die reaktive Form von Sauerstoff in biologischen Reaktionen der angeregte Singlet-Zustand sei (96, 97). Dagegen spricht, daß Singlet Sauerstoff in Modellreaktionen mit Alkanen oder nichtaktivierten Aromaten nicht reagiert.
In den letzten Jahren wurden schließlich einige Modellreaktionen zum sogenannten Oxenoid-Mechanismus untersucht. 1964 hatte Hamilton (98) zum ersten Mal vorgeschlagen, daß Monoxygenasen

ihre Reaktion durch einen Sauerstoffatom-Transfer oder Oxenoid-Transfer katalysieren. Analog zu Carben- und Nitrenreaktionen besitzt ein Oxen-Sauerstoff nur sechs Elektronen in der äußeren Elektronenschale. Das Auftreten einer solchen Sauerstoffspezies, d.h. eines freien Sauerstoffatoms, in biochemischen Reaktionen ist jedoch aus energetischen Gründen unwahrscheinlich. Deswegen wurde vorgeschlagen (98), daß in vielen Monoxygenasereaktionen das oxidierende Agens im Übergangszustand eine Spezies ist, die ein Sauerstoffatom auf ein Substrat übertragen kann. Ein solcher Mechanismus wird Oxenoid-Mechanismus genannt. Hinweise für das Ablaufen eines solchen Mechanismus sind der sogenannte NIH-shift (99, 100) und Modellreaktionen von Ullrich (101).

1.8. Carcinogenese durch polycyclische Kohlenwasserstoffe

Von den vielen externen Stoffen, die krebsartiges Wachstum in tierischen Zellen hervorrufen können, sind polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe am intensivsten untersucht worden, und diese Stoffe besitzen seit langem eine zentrale Stellung in der Krebsforschung. In den dreißiger Jahren isolierten Kennaway und Cook das aktive chemische Carcinogen aus Kohlenteer und identifizierten es als Benzo[α]pyren. Seit dieser Zeit sind eine Vielzahl von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen gefunden worden, die cancerogen sind.
Trotz der bemerkenswerten Forschungsarbeit während der letzten 20 Jahre ist die molekulare Basis der Wirkungsweise dieser cancerogenen Stoffe nur unvollständig bekannt. Bisher konnte noch

keine endgültige Antwort auf die Frage gegeben werden, welches der Angriffspunkt der Cancerogene in der Zelle ist. Sowohl Proteine als auch Nukleinsäuren werden von den Stoffen kovalent gebunden, und das Entstehen des Krebses könnte sowohl durch eine Veränderung der Wirkungsweise von Enzymen als auch des Ablesemechanismus an der Nukleinsäure bedingt sein.
Polycyclische Kohlenwasserstoffe werden erst durch Aktivierung durch die mischfunktionelle Oxidase cancerogen, wahrscheinlich primär durch Bildung eines Epoxids, das als sehr reaktive Gruppe selbst oder nach Bildung eines Carbonyls eine kovalente Bindung eingehen kann. Besonders leicht erfolgt diese Aktivierung in der sogenannten K-Region (138). Für die Cancerogenese ebenfalls sehr wichtig ist zumindestens im Fall von Benzpyren das 9, 10-Epoxid (139), und eine ähnliche Verbindung, die nicht in der K-Region aktiviert ist (7,8-Dihydroxy-9,10-Epoxy-7,8,9,10-Tetrahydrobenzpyren), ist der am stärksten cancerogen wirkende Metabolit von Benzpyren (140).
Die Aktivierung von polycyclischen Kohlenwasserstoffe erfolgt hauptsächlich in Lebermikrosomen, zu einem geringen Teil aber auch in der äußeren Kernmembran (141) und möglicherweise auch in der äußeren Memoran der Mitochondrien (142). Die terminale Oxidase in Lebermikrosomen ist Cytochrom P-448, das in seinen bekannten Eigenschaften Cytochrom P-450 sehr ähnlich ist, jedoch überwiegend polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe aktiviert und auch von diesen Stoffen induziert wird. Die übrigen Komponenten, die für die Aktivierung der cancerogenen Stoffe benötigt werden, sind dieselben wie die des Cytochrom P-450 abhängigen Systems.

Dadurch, daß also primär nicht onkogene Stoffe erst nach Oxygenierung durch das Cytochrom P-448-System zu Cancerogenen in der Zelle gemacht werden, kommt den Eigenschaften und Reaktionen dieses Enzymsystems eine folgenschwere Bedeutung zu. Das Verständnis des Mechanismus der Oxygenierung könnte evtl. dazu führen, daß das Auftreten einiger Krebsarten, die durch exogene Stoffe hervorgerufen werden, durch Beeinflussung dieses Mechanismus verhindert wird.

1.9. Ziel der vorliegenden Arbeit

Ausgangspunkt dieser Arbeit über die Rolle aktiver Sauerstoffspezies während der mikrosomalen Hydroxylierung war die Vielzahl der Untersuchungen über den Mechanismus der Hydroxylierung an Modellsystemen und die Demonstration, daß in einem rekonstituierten mikrosomalen System das Superoxid Radikal eine wichtige Zwischenstufe während der enzymatischen Hydroxylierung darstellt.
Die Bedeutung der Kompartmentierung und Inhomogenität in biologischen Systemen wird immer klarer. Es erschien deswegen wichtig, den Mechanismus der Hydroxylierung an intakten Mikrosomen zu untersuchen. Die Zugänglichkeit der mikrosomalen terminalen Oxidase mußte dabei besonders berücksichtigt werden. Deswegen sollte mit Hilfe von niedermolekularen hydrophilen und hydrophoben Verbindungen, welche mit angeregten Sauerstoffspezies reagieren, in intakten Rattenlebermikrosomen eine Hemmung der Hydroxylierungsreaktion herbeigeführt werden. Durch geeignete Kontrollversuche sollte die

Spezifität einer eventuellen Hemmung der Hydroxylierung und somit die Teilnahme der betreffenden aktiven Sauerstoffspezies am Hydroxylierungsmechanismus in der mikrosomalen Membran nachgewiesen werden. Schließlich sollte untersucht werden, inwieweit sich die Reaktionen an den verschiedenen terminalen Oxidasen der Mikrosomenmembran (d.h. Cytochrom P-450 im Vergleich mit Cytochrom P-448, welches polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe zu cancerogenen Stoffen aktiviert) in ihrem Mechanismus unterscheiden.

2. Experimenteller Teil

2.1. Material und Geräte

2.1.1. Verwendete Substanzen

Die Reagenzien und Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen: Isocitratdehydrogenase (Schweineherz), Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (reduzierte Form, tetra-Natriumsalz), Nicotinamidadenindinucleotid (reduzierte Form, di-Natriumsalz) von Böhringer, Mannheim. Ferricytochrom c (Typ VI, Pferdeherz), Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase (Typ VII), Glucose-6-Phosphat (mono-Natriumsalz), D,L-Isocitrat (Typ I, tri-Natriumsalz), Benzo[α]pyren, Mersalyl, Diphenylfuran und Methional von Sigma Chemical Co., St.Louis, Mo., USA. Superoxid Dismutase von Miles Laboratories, Kankakee, Ill., USA. Methylcholanthren von K and K Laboratories, Hollywood, Cal., USA. Tiron und Tetranitromethan von Ega-Chemie, Steinheim. Cumolhydroperoxid von Peroxid-Chemie München GmbH Höllriegels-

kreuth. 3-Chlorperbenzoesäure von Fluka AG, Buchs, Schweiz. [G^{3}H]-Benzo[α]pyren (spezifische Aktivität 20 Ci/mMol, 79,3 mCi/mg) von The Radiochemical Centre, Amersham, England.

Kristalline Kupferkomplexe von Aminosäuren und Aspirinderivaten wurden nach der Methode von Weitzel und Mitarbeitern (102) dargestellt und wurden mir freundlicherweise von Prof. U.Weser, Physiologisch-chemisches Institut der Universität Tübingen, zur Verfügung gestellt. ^{14}C-markiertes Tyr_2-Cu^{2+} wurde nach derselben Methode dargestellt und war ein Geschenk von Herrn Diplom-Biochemiker Maged Younes. Die Stammlösung war 1.6 mM und besaß eine spezifische Aktivität von 24.3 mCi/mMol. Zur Beseitigung von Glycerin (Stabilisator des radioaktiven Tyrosins) wurde die Probe lyophilisiert, in Puffer aufgenommen und eine Stunde unter Rückfluß gekocht. Im enzymatischen Test (Dealkylierung von 7-Äthoxycoumarin) inhibierten 60 µM der enthaltenen Lösung zu 100% und 25 µM zu 50%.

7-Äthoxycoumarin wurde folgendermaßen dargestellt: 5 gr 7-Hydroxycoumarin und 10 gr Äthyljodid wurden in Gegenwart von trockenem K_2CO_3 in 40 ml Aceton gelöst und 4 Stunden bei 50°C gerührt. Die Lösung wurde mit Wasser versetzt und über Nacht bei 4°C gehalten. Der erhaltene Niederschlag wurde in wässrigem Methanol umkristallisiert. Schmelzpunkt 88°C (Lit.: 88°C). Im Dünnschichtchromatogramm erschien die Probe homogen. Ausbeute: 2 gr.

Alle anderen Chemikalien, die hier nicht einzeln aufgeführt sind, waren p.a. Substanzen der Firma Merck, Darmstadt.

2.1.2. Verwendete Geräte

Sauerstoff wurdepolarographisch mit Hilfe einer Clark-Elektrode der Firma Eschweiler und Co., Kiel, bestimmt.
pH-Werte wurden mit einer Glaselektrode Typ 202C der Firma Radiometer, Kopenhagen, und dem Philips pH-Meter PM 9408 gemessen.
Zur Zentrifugation wurde eine automatisch gekühlte Sorvall-Zentrifuge (Ivan Sorvall, Inc. Newton, Conn., USA.) mit dem Rotor SS-34 und Ultrazentrifugen von Sorvall bzw. MSE (Measuring and Scientific Equipment Ltd., London, England) verwendet.
Fluoreszenzmessungen wurden in einem thermostatisierbaren Eppendorf-Photometer mit Fluoreszenzzusatz 1030 der Firma Netheler und Hinz, Hamburg, durchgeführt.
Absorptionsänderungen wurden in einem Hitachi Perkin-Elmer Modell 124 oder in einem Dual-Wellenlängenspektralphotometer mit einem 400 Hz Chopper verfolgt, während Differenzspektren mit einem "split-beam"-Spektralphotometer aufgenommen wurden. Die beiden letztgenannten Geräte sind eine Konstruktion der Johnson Research Foundation, Univerity of Philadelphia, Philadelphia, USA. Für die Messung schneller Absorptionsänderungen wurde eine Regenerativer Flow-Apparat (103) (konstruiert in der Johnson Research Foundation) in Verbindung mit einem Tektronics Storage Oscilloscope und einer Polaroid-Kamera verwendet.
Dünnschichtchromatogramme der Benzpyrenderivate wurden mit einem Hitachi Perkin-Elmer Fluorimeter MPF 4, ausgerüstet mit

einem Chromatogrammscanner, quantitativ bestimmt. Radioaktive Proben wurden in einem Flüssigkeitsszintillationszähler Tricarb gemessen. Elektronenspinresonanzspektren wurden in einem Varian E4 aufgenommen.

2.2. Methoden

2.2.1. Puffer

Als Reaktionspuffer wurde 150 mM KCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.75, 10 mM $MgCl_2$ (TKM-Puffer) verwendet, der, falls nicht anders angegeben, als NADPH-regenerierendes System 7 mM Isocitrat und 0.3 U Isocitratdehydrogenase/ml enthielt. Um NADPH vor dem Angriff von Nucleotidasen zu schützen, wurde dem Puffer 10 mM Nicotinamid zugesetzt.

2.2.2. Mikrosomenisolierung

Intakte induzierte Lebermikrosomen wurden nach der Standardmethode von Remmer und Mitarbeitern (104) isoliert. Dazu wurden junge männliche Albinoratten (180 - 250 gr) verwendet. Zur Induktion von Cytochrom P-450 wurden den Tieren täglich während vier Tagen intraperitoneale Injektionen von 80 mg Natriumphenobarbital in physiologischer Kochsalzlösung pro kg Körpergewicht verabreicht. Nach der letzten Injektion wurde ihnen das Futter entzogen, und 24 Studen später wurden die Tiere getötet. Zur Induktion von Cytochrom P-448 wurde den Tieren 40 Stunden vor der Tötung 20 mg Methylcholanthren pro kg Körpergewicht, suspendiert in 0,5 ml Olivenöl, intraperi-

toneal injiziert.

2.2.3. Cytochromgehalt

Der Gehalt an Mikrosomen an Cytochrom P-450, P-448 und P-420 wurde folgendermaßen bestimmt: 0.2 ml mikrosomalen Proteins (ca. 50 mg/ml) wurden mit TKM-Puffer auf 6 ml aufgefüllt, mit Dithionit reduziert, zu gleichen Teilen auf Proben- und Referenzküvette eines Hitachi Perkin-Elmer Spektralphotometer (Modell 124) verteilt und die Absorption im Bereich von 500 bis 400 nm bestimmt. Anschließend wurde die Probenküvette ca. 30 sec mit CO begast, die Absorptionsmessung wiederholt und die Absorptionsdifferenz zwischen der Referenzwellenlänge (490 nm) und der Peakwellenlänge (450, 448 bzw. 420 nm) bestimmt. Der Extinktionskoeffizient ist unter diesen Bedingungen $\varepsilon = 91\ mM^{-1}\ cm^{-1}$ (56).

Zur Bestimmung des Gehalts der Mikrosomen an Cytochrom b_5 wurde analog verfahren mit der Ausnahme, daß mit 200 µM NADH (und in Abwesenheit von CO) reduziert wurde. Die Extinktionsdifferenz zwischen 424 und 409 nm wurde bestimmt, und als Extinktionskoeffizient diente $\varepsilon = 164\ mM^{-1}cm^{-1}$ (105).

2.2.4. Bestimmung enzymatischer Aktivitäten

2.2.4.1. NADPH-Cytochrom c Reduktase wurde in einem Hitachi Perkin-Elmer Spektralphotometer (Modell 124) gemessen. Mikrosomen wurden mit TKM-Puffer auf 0.3 mg/ml verdünnt und Ferricytochrom c zu einer Endkonzentration von 0.1 mM zugefügt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 mM NADPH gestartet und

die Bildungsrate von Ferrocytochrom c bei 550 nm bestimmt. Als Extinktionskoeffizient diente ε = 19.8 $mM^{-1}cm^{-1}$.

2.2.4.2. NADPH-Cytochrom P-450 Reduktase wurde in einem Dual-Wellenlängenspektralphotometer in Kombination mit einem Regenerativen Flow-Apparat (103) gemessen. Die große Spritze enthielt eine Mikrosomensuspension in TKM-Puffer (0.5 mg/ml), die 5 min mit CO begast worden war. Um die Anaerobiose aufrechtzuerhalten, wurde darüberhinaus 10 mM Glucose und 2 U Glucoseoxidase zugefügt. Die kleine Spritze enthielt 100 mM NADPH, sodaß die NADPH-Konzentration nach dem Mischen 0.55 mM betrug. Die Bildung des Komplexes zwischen reduziertem Cytochrom P-450 und CO wurde bei dem Wellenlängenpaar 450-490 nm gmessen (ε = 91 $mM^{-1}cm^{-1}$) und mit Hilfe eines Speicheroszillographen registriert.

2.2.4.3. Die Reduktion von Cytochrom b_5 wurde ebenfalls in einem Dual-Wellenlängenspektralphotometer in Kombination mit einem Regenerativen Flow-Apparat (103) gemessen. Mikrosomen wurden in der großen Spritze des Flow-Apparats in TKM-Puffer suspendiert (0.3 mg/ml). Die kleine Spritze enthielt 100 mM NADPH. Die Reduktionsrate von Cytochrom b_5 wurde bei 557-540 nm gemessen und mit Hilfe eines Speicheroszillographen registriert.

2.2.4.4. p-Nitroanisol O-Demethylase-Aktivität wurde in einem Dual-Wellenlängenspektralphotometer über die Bildungsrate des Produktes p-Nitrophenol bestimmt. Als Mess- und Referenzwellenlänge diente 417 bzw. 490 nm. Der Extinktionskoeffizient von

p-Nitrophenol beträgt hierbei ε = 13.2 $mM^{-1}cm^{-1}$. Der Inkubationsansatz bestand aus 2 ml einer Mikrosomensuspension in TKM-Puffer (1 mg/ml) in Gegenwart von 7 mM Isocitrat, 10 mM Nikotinamid und 0.4 U Isocitrat Dehydrogenase. Die Konzentration des Substrats p-Nitroanisol betrug gewöhnlich 1 mM. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 mM NADPH gestartet.

2.2.4.5. O-Dealkylierung von 7-Äthoxycoumarin. Bei dieser Dealkylierungsreaktion der mikrosomalen Monoxygenase wurde in einem Eppendorf-Fluorimeter die Bildungsrate des Produkts Umbelliferon direkt fluorimetrisch bestimmt (106). 350 µg mikrosomalen Proteins wurden in 1 ml TKM-Puffer in Gegenwart des NADPH-regenerierenden Systems und Nikotinamids suspendiert. Die Konzentration des Substrats betrug 125 µM. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 mM NADPH oder 2 mM 3-Chlorperbenzoesäure gestartet. Am Ende der Reaktion wurde die Fluoreszenz durch Zugabe definierter Mengen Umbelliferons kalibriert.

2.2.4.6. Die N-Demethylierung von Aminopyrin wurde in 1 ml TKM-Puffer in Gegenwart von 1 mM Semicarbazid und 10 mM Nikotinamid gemessen. Das NADPH-regenerierende System bestand in diesem Fall aus 1 mM Glucose-6-Phosphat und 2.6 U Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase. Die Konzentration von Aminopyrin betrug 10 mM. Die Reaktion wurde mit 1 mM NADPH gestartet. Das Produkt Formaldehyd wurde mit Hilfe der Methode von Nash (107), modifiziert nach McLean (108), bestimmt:

2.2.4.7. Bestimmung von Formaldehyd. Zur Messung des bei der mikrosomalen Demethylierung freiwerdenden Formaldehyds wurde

1 ml Mikrosomensuspension durch Zugabe von 1 ml 20%igen $ZnSO_4$ und 1 ml gesättigten $Ba(OH)_2$ deproteinisiert. Nach Zentrifugation (10 min, 15 000 U/min) wurden 0.5 ml des Überstandes mit 0.5 ml H_2O und 1 ml Nash-Reagenz (4 M Ammoniumacetat, 1 M Essigsäure, 40 mM Acetylaceton) versetzt. Darauf wurde bei 60°C 30 min lang inkubiert. Nach Abkühlung wurde mit 1.5 ml Amylalkohol extrahiert und die Absorption bei 421 nm gegen einen Blindwert (2ml H_2O mit 2 ml Nash-Reagenz) gemessen.

2.2.4.8. Benzo[α]pyren-Monoxygenaseaktivität wurde auf drei verschiedene Arten gemessen:

1.) Fluorimetrisch mit einer modifizierten Methode nach Nebert und Gelboin (109). In diesem Fall wird hauptsächlich das Produkt 3-OH-Benzpyren neben geringen Mengen von 9-OH-Benzpyren bestimmt.

2.) Mittels ^3H-markierten Benzpyrens wurde die Gesamtmenge des verstoffwechselten Benzpyrens nach DePierre et al. (110) gemessen.

3.) Ebenfalls mit markiertem Benzpyren wurde das relative Ausmaß der Bildung der verschiedenen Benzpyrenderivate nach Kinoshita et al. (111) entweder in einem Szintillationszähler (a.) oder autoradiographisch (b.) untersucht. Wegen der Lichtempfindlichkeit von Benzpyren wurden alle Operationen im Dunkeln oder unter Rotlicht durchgeführt. Die Inkubationstemperatur betrug in allen Fällen 37°C. In allen Experimenten wurden Mikrosomen Methylcholanthren-induzierter Ratten verwendet.

1.) Fluorimetrische Bestimmung: In einem Gesamtvolumen von 1 ml (TKM-Puffer, NADPH-regenerierendes System, Nicotinamid, 1 mM NADPH) wurden 20 µl Aceton-gelöstes Benzpyren zu einer Endkonzentration von 80 µM zugefügt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 bis 150µg mikrosomalen Proteins gestartet. Zur Beendigung der Reaktion wurde 1 ml eiskaltes Aceton zugegeben. Um die lipidlöslichen Produkte zu extrahieren, wurden 3.25 ml Hexan zugegeben und 2 min auf einem Vortex gemischt. Darauf wurde 1 ml der Hexanphase mit 3 ml 1 N NaOH extrahiert. Die Konzentration des extrahierten Hydroxybenzpyrenanions wurde in einem Eppendorf-Fluorimeter fluorimetrisch bestimmt. Anregung: 386 nm, Emission: 525 nm. Blindwerte wurden mit Proben erhalten, die von Beginn 1 ml Aceton enthielten.

2.) Gesamtmetabolismus von Benzpyren: Die Inkubation wurde wie unter 1.) beschrieben durchgeführt. Die Radioaktivität des Benzpyrens betrug 1 µCi. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml 0.5 NaOH in 80%igem Äthanol gestoppt. Zur Extraktion der Stoffwechselprodukte wurden 3 ml Hexan zugefügt und 2 min auf einem Vortex gemischt. Die Proben wurden darauf bei niedriger Geschwindigkeit auf einer Tischzentrifuge zentrifugiert und 300 µl der unteren Phase (die die Produkte enthält) mit einer Mikrospritze entfernt und mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit gemischt. Nach 12 Stunden wurde die Radioaktivität der Proben bestimmt.

3.) Relatives Ausmaß der Benzpyren-Stoffwechselprodukte: Für diese Bestimmung wurden die Stoffwechselprodukte chromatographisch aufgetrennt. Die Inkubation erfolgte wie unter 2.) mit der Ausnahme, daß die Radioaktivität 2 µCi betrug, wenn die Proben nach der Chromatographie fraktioniert werden sollten,

bzw. 100 µCi, wenn eine Autoradiographie durchgeführt werden sollte. Die Inkubation wurde mit 1 ml eiskaltem Aceton gestoppt, mit 2 ml eiskaltem Äthylacetat versetzt und 2 min auf einem Vortex gemischt. Die organische Phase wurde mit einer Pasteur-Pipette entfernt und durch Zugabe von wasserfreiem $NaSO_4$ getrocknet. Anschließend wurde an einem Rotationsverdampfer bei 40°C und niederem Druck auf 50 µl eingeengt. Die eingeengten Produkte wurden mit einer Mikrospritze vollständig auf eine Kieselgelplatte (Merck) aufgetragen und mit Methanol/Benzol (5:95 v/v) als Laufmittel getrennt. Nachdem die Laufmittelfront ca. 8 cm gelaufen war, wurde getrocknet.

a. Mit Hilfe eines 2 mm breiten Spatels wurde das Kieselgel fraktioniert, quantitativ in 5 ml Szintillationsflüssigkeit überführt und ausgezählt.

b. Im Falle der Autoradiographie wurde die Kieselgelplatte 24 Stunden mit einem photographischen Film in Kontakt gebracht, dieser entwickelt und mit Hilfe eines Hitachi Perkin-Elmer Fluorimeter MPF4,ausgerüstet mit Chromatogrammscanner, vermessen.

2.2.4.9 Nachweis von O_2^- Radikalen in Mikrosomen

a. Adrenochrombildung. Mikrosomen (0.5 mg/ml) wurden in TKM-Puffer in Gegenwart von 1 mM Adrenalin und einem NADPH-regenerierenden System in die Küvette eines Dual-Wellenlängenspektralphotometers suspendiert und nach Zugabe von NADPH die Extinktionszunahme,bedingt durch die Oxidation von Adrenalin zu Adrenochrom,bei 480-575 nm verfolgt. Bei diesem Wellenlängenpaar beträgt der Extinktionskoeffizient ε = 2.86 $mM^{-1}cm^{-1}$.

Mit Hilfe dieses Wertes wurde die Oxidationsrate von Adrenalin bestimmt.

b. Reduktion von acetyliertem Cytochrom c. Nach Azzi und Mitarbeitern (18) kann die Reduktion von acetyliertem Cytochrom c in isolierten Mitochondrien- und Mikrosomenmembranen zur Bestimmung von O_2^- verwendet werden. Mikrosomenmembranen wurden in 6 ml Puffer (250 mM Sucrose, 10 mM Tris-HCl pH 7.4) auf 235 µg Protein/ml verdünnt, mit 10.7 µM acetyliertem Cytochrom c versetzt und auf Proben- und Referenzküvette eines Hitachi Perkin-Elmer Spektralphotometer (Modell 124) verteilt. Nach Zugabe von 1 mM NADPH zur Probenküvette wurde die Reduktionsrate des Cytochroms bei 550 nm gemessen.

c. Die Bildung von Nitroform aus Tetranitromethan als Indikator für O_2^- (112) wurde in demselben Puffer, der für die Adrenochrombildung verwendet wurde, in einem Hitachi Perkin-Elmer Spektralphotometer (Modell 124) bei 350 nm gemessen. Die Proteinkonzentration betrug 0.5 mg/ml. Ein Extinktionskoeffizient $\varepsilon = 15\ mM^{-1}cm^{-1}$ für Nitroform wurde den Berechnungen zugrunde gelegt.

2.2.4.10. Die Sauerstoffaufnahme wurde mit einer Clark-Elektrode gemessen. Dazu wurden Mikrosomen in TKM-Puffer, der 10 mM Nicotinamid und ein NADPH-regenerierendes System enthielt, auf 2.5 mg/ml verdünnt. Das Totalvolumen betrug 2.7 ml. Die Sauerstoffaufnahme wurde durch Zugabe von 1 mM NADPH gestartet.

2.2.4.11. Die Kinetik der Bildung des "Ferryl-Intermediates" (113) von Cytochrom P-450 wurde in einem Regenerativen Flow-Apparat analog der Messung der Reduktion von Cytochrom b_5 (vgl. 2.2.4.3.) verfolgt. Das verwendete Wellenlängenpaar war 440-468 nm. Die mikrosomale Proteinkonzentration betrug 2.5 mg/ml, und die Endkonzentration von Cumolhydroperoxid war 330 µM.

2.2.4.12. Benzpyren-6-Phenoxyradikale (114) wurden folgendermaßen bestimmt: In einem offenen 50 ml Becherglas wurden 20 ml TKM-Puffer in Gegenwart von 10 mM Nicotinamid und eines NADPH-regenerierenden Systems mit 80 µM Benzpyren versetzt. Nach Zugabe von 100 mg Methylcholanthren-induzierten mikrosomalen Proteins wurde die Reaktion mit 1 mM NADPH gestartet. Nach dreistündiger Inkubation im Dunkeln (Zimmertemperatur) wurden 22 ml Benzol zugegeben und 10 min gerührt. Nach 10stündigem Stehenlassen wurden 15 ml des Benzolüberstandes zur Trockne eingeengt und mit 150 µl Benzol aufgenommen. Das Elektronenspinresonanzsignal wurde in einem Varian E4 aufgenommen.

2.2.4.13. Bindungsstudie: 2 ml TKM-Puffer wurden in Zentrifugenröhrchen pipettiert und 3 mg Methylcholanthren-induziertes mikrosomales Protein (Cytochrom P-448-Gehalt: 2 nMole) zugegeben. Danach wurde ^{14}C-markiertes Tyr_2-Cu^{2+} zugefügt, gemischt und eine Stunde bei 105 000 x g zentrifugiert. 50 µl des Überstandes wurden in 5 ml Szintillationsflüssigkeit überführt und die Radioaktivität bestimmt. Mit Hilfe der bekannten spezifischen Radioaktivität des Kupferkomplexes wurde die im mikrosomalen Pellet verbliebene Menge an Tyr_2-Cu^{2+} zurückgerechnet.

3. Ergebnisse

3.1. Bildung von Superoxidradikalen in Mikrosomen

3.1.1. Bestimmung mit Hilfe von acetyliertem Cytochrom c

Cytochrom c wurde wegen seines hohen Extinktionskoeffizienten und seiner Reaktivität mit O_2^- Radikalen schon früh als Indikator für Superoxid in nicht-biologischen Tests verwendet. Da Cytochrom c Reduktasen in Memoranen vorkommen, konnte natives Cytochrom c nicht als O_2^- -Indikator in Mitochondrien oder Mikrosomen benutzt werden. Daher modifizierten wir[1] natives Cytochrom c durch Acetylierung der Lysinreste derart, daß es zwar durch O_2^-, nicht aber durch membrangebundene Reduktasen direkt reduziert werden kann.
Mikrosomale O_2^- -Produktion wurde in einem Hitachi Perkin-Elmer Spektrophotometer in 250 mM Sucrose, 10 mM Tris-HCl pH 7.4 in Gegenwart von 10.7 µM acetyliertem Cytochrom c und 235 µg Protein/ml gemessen. Nach Zugabe von 1 mM NADPH wurde eine Reduktionsrate von 0.8 nMolen Cytochrom c reduziert pro Minute und mg Protein gefunden.

3.1.2. Bestimmung mit Hilfe des Adrenalintests

Die Oxidation von Adrenalin zu Adrenochrom kann als Test für O_2^- -Radikale verwendet werden (115). Um die Bildung des Superoxids in Mikrosomen zu messen, und um die scheinbare Michaeliskonstante $K_{M\ app}$ zu bestimmen, wurde die Adrenochrom-

[1] Das Ergebnis wurde in Ref. (18) veröffentlicht.

bildung in einem Dual-Wellenlängenspektralphotometer bei dem Wellenlängenpaar 480-575 nm in Abhängigkeit der Sauerstoffkonzentration gemessen. Dazu wurde sauerstoffgesättigter TKM-Puffer in Gegenwart 10 mg mikrosomalen Proteins und 1 mM Adrenalin in einer verschließbaren Küvette mit stickstoffgesättigtem TKM-Puffer auf 5 ml aufgefüllt und die Adrenochrombildungsrate nach Zugabe von 1 mM NADPH gemessen. Abb. 5 zeigt die Bildung von Adrenochrom in Abhängigkeit der Sauerstoffkonzentration. Mit Hilfe einer doppelt reziproken Auftragung läßt sich ein $K_{M\ app}$ für O_2^- von etwa 60 µM bestimmen.

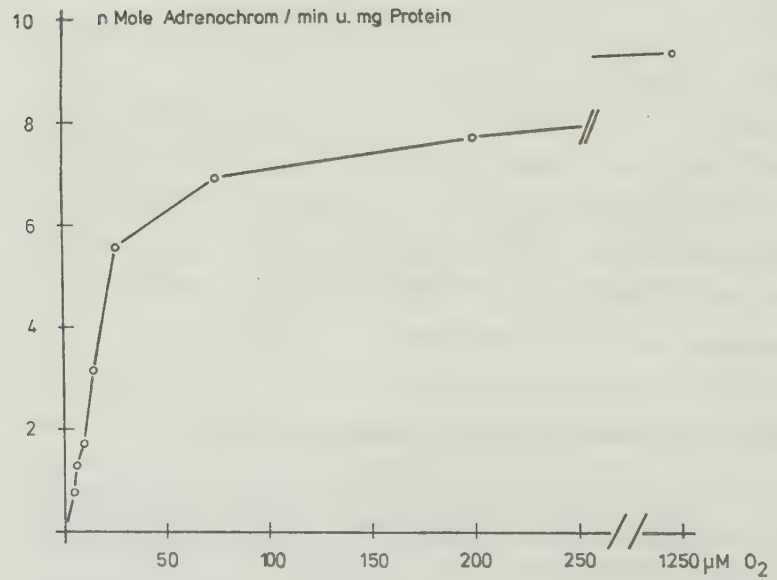


Abb. 5: Abhängigkeit der mikrosomalen Adrenochrombildung von der Sauerstoffkonzentration.

Die Bildung von Adrenochrom wird durch Tyr_2-Cu^{2+} oder Tiron inhibiert, Substanzen, die mit O_2^- reagieren (Tab. 3).

Tab. 3: Bildung von O_2^- in Mikrosomen und Inhibierung durch Tyr_2-Cu^{2+} oder Tiron

	nMole Adrenochrom gebildet/ min u. mg
kein Inhibitor	13.4
+ 50 µM Tyr_2-Cu^{2+}	5.2.
kein Inhibitor	12.6
+ 10 mM Tiron	8.2

Das Flavoprotein NADPH-Cytochrom c Reduktase produziert O_2^- -Radikale (116). Das organische Quecksilberreagens Mersalyl inhibiert NADPH-Cytochrom c Reduktase, NADPH-Cytochrom P-450 Reduktase und die N-Demethylierung von Äthylmorphin in Rattenlebermikrosomen bei einer Konzentration von 25 ng/mg mikrosomales Protein zu 50% und inhibiert bei steigender Menge diese Aktivitäten vollständig (81). Die Produktion von O_2^- ist bei etwa 30 ng/mg Protein zwar auch zu etwa 50% inhibiert, eine Erhöhung der Mersalylkonzentration führt jedoch zu keiner vermehrten Inhibierung der Produktion von O_2^- (Abb. 6).

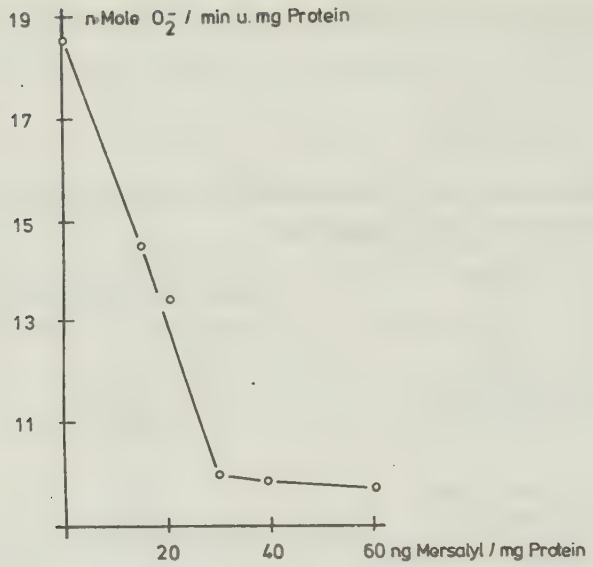


Abb. 6: Inhibierung der mikrosomalen Adrenochrombildung durch das Quecksilberreagenz Mersalyl.

Diese Untersuchungen zeigen, daß intakte Rattenlebermikrosomen nach NADPH-Zugabe O_2^- Radikale produzieren.

3.2. Cytochrom P-450-abhängige Hydroxylierung in intakten Mikrosomen und Inhibierung durch O_2^- -Quencher

Die Beteiligung von O_2^- -Radikalen am Mechanismus der mikrosomalen Hydroxylierung ist schon frühzeitig postuliert worden. Experimentelle Hinweise für eine solche Beteiligung in intakten Lebermikrosomen fehlten jedoch bisher; so inhibierte das

Enzym Superoxid Dismutase, das O_2^- abfängt, die Hydroxylierung nicht, die in intakten Membranen ablief (85), war jedoch im rekonstituierten System wirksam. In diesem System konnte NADPH-Cytochrom c Reduktase durch ein O_2^- -regenerierendes System,Xanthin und Xanthinoxidase, ersetzt werden (85).

Diese Experimente ließen vermuten, daß Superoxidanionen als Zwischenstufen während der Hydroxylierung auftreten. Sie ließen aber auch die Möglichkeit offen, daß Superoxid in dem rekonstituierten System als Reduktant von Cytochrom P-450 dient und keine echte Zwischenstufe während der Hydroxylierung darstellt. Darüberhinaus ist die Tatsache, daß Superoxid Dismutase in der intakten Membran nicht inhibiert, kein Beweis dafür, daß O_2^- nicht als Zwischenstufe auftritt, da das große und polare Enzymmolekül möglicherweise nicht in der Lage ist, seine katalytische Wirkung an oder nahe des aktiven Zentrums an Cytochrom P-450 auszuüben.

Dismutaseaktivität ist nicht allein auf das Enzym Superoxid Dismutase beschränkt. Viele niedermolekulare Metallkomplexe zeigen eine Aktivität, die der des Enzyms nahekommt. Wegen ihrer geringen Größe (Molekulargewicht etwa einhundert Mal geringer als das des Enzyms) und wegen der Möglichkeit, ihre Polarität durch geeignete Wahl des Chelators zu steuern, sollte es möglich sein, mit Hilfe solcher Metallkomplexe Aussagen über die mögliche Beteiligung von O_2^- an der Cytochrom P-450-abhängigen Hydroxylierung in intakten Lebermikrosomen zu machen.

3.2.1. p-Nitroanisol O-Demethylierung und Inhibierung durch O_2^- -Quencher[1]

Die O-Demethylierung von p-Nitroanisol zu p-Nitrophenol durch intakte Rattenlebermikrosomen wurde in einem Dual Wellenlängenspektralphotometer mit dem Wellenlängenpaar 417-480 nm bei niedrigen (34 µM) und hohen (3 mM) Substratkonzentrationen und verschiedenen Konzentrationen von Tyr_2-Cu^{2+} gemessen. Dieser Kupferkomplex besitzt hohe Dismutaseaktivität (15). In Abb. 7 ist ersichtlich, daß die Substratdemethylierung in Gegenwart niederer Konzentrationen des Komplexes inhibiert wird. 50% Inhibierung erhält man mit 10 und 17 µM Komplex bei niedrigen bzw. hohen Substratkonzentrationen.

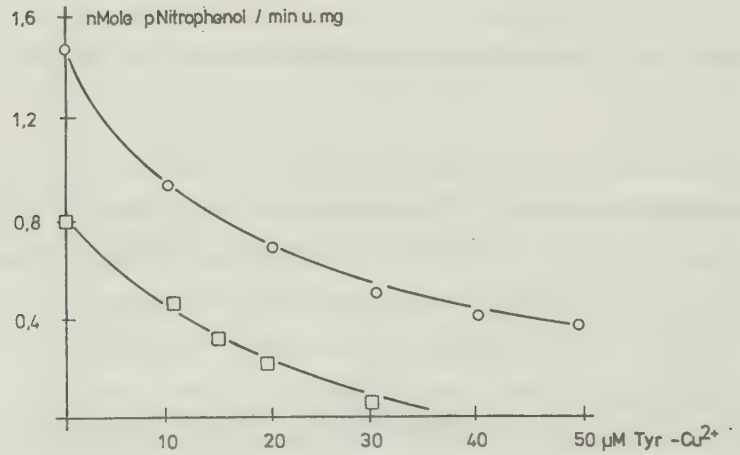


Abb. 7: Inhibierung der mikrosomalen O-Demethylierung von p-Nitroanisol zu p-Nitrophenol durch Tyr_2-Cu^{2+}. o——o 3 mM p-Nitroanisol, □——□ 34 µM p-Nitroanisol.

[1] Das Ergebnis wurde in Ref. (117) veröffentlicht

In Tab. 4 ist die Wirkung verschiedener Verbindungen mit Superoxid Dismutaseaktivität auf die mikrosomale O-Demethylierung bei einer Substratkonzentration von 34 µM dargestellt.

Tab. 4: Inhibierung der mikrosomalen O-Demethylierung von p-Nitroanisol zu p-Nitrophenol durch Verbindungen mit Superoxid Dismutaseaktivität

	nMole p-Nitrophenol gebildet/ min u. mg	%Inhibition
kein Inhibitor	0.62	--
50 µM $CuSO_4$	0.55	11.3
2.5 µM Superoxid Dismutase	0.64	0.0
50 µM FeSO + 100 µM EDTA	0.49	21.0
55 µM Lys-Cu^{2+}	0.64	0.0
115 µM Lys-Cu^{2+}	0.42	32.3
220 µM Lys-Cu^{2+}	0.36	42.0
50 µM Tyr_2-Cu^{2+}	0.00	100.0

$CuSO_4$, einer der aktivsten Katalysatoren der Dismutation von Superoxid Radikalen, ergibt nur eine geringe Inhibition. Superoxid Dismutase, wie schon bekannt, bewirkt keine Inhibierung, während ein Komplex aus Fe^{2+} und EDTA ebenfalls nur geringfügig inhibiert. Der unpolare Kupferkomplex Tyr_2-Cu^{2+} erwies sich als sehr viel aktiver als der polare Lys-Cu^{2+} Komplex. Für eine 40%ige Inhibierung der O-Demethylierung sind 220 µM Lys-Cu^{2+} nötig, während dieselbe Inhibierung schon mit etwa 15 µM Tyr_2-Cu^{2+} erreicht wird.

3.2.2. Aminopyrin N-Demethylierung und Inhibition durch den O_2^- -Quencher Tyr_2-Cu^{2+} [1]

Bei einer Substratkonzentration von 1 mM Aminopyrin wurde nach einer Inkubation von 10 min die N-Demethylierung durch Messung der Formaldehydproduktion in Gegenwart und Abwesenheit von 10 µM Tyr_2-Cu^{2+} gemessen. Der Kupferkomplex bewirkte eine Inhibierung von 85% (12 nMole Formaldehyd pro mg Protein in Gegenwart, 80 nMole Formaldehyd pro mg Protein in Abwesenheit von Tyr_2-Cu^{2+}).

3.2.3. 7-Äthoxycoumarin O-Deäthylierung und Inhibition durch den O_2^- -Quencher Tyr_2-Cu^{2+} [1]

Abb. 8 zeigt die Wirkung von Tyr_2-Cu^{2+} bei der Deäthylierung von 7-Äthoxycoumarin in Gegenwart von 200 µM Substrat. Eine Inhibierung von 50% wird mit etwa 15 µM Kupferkomplex erreicht.

3.2.4. Inhibierung mikrosomaler Dealkylierung durch entzündungshemmende und Superoxid Dismutase-aktive Cu^{2+}-Chelate [2]

Angeregte Sauerstoffspezies wie O_2^- oder OH· spielen möglicherweise eine wichtige Rolle im Entzündungsprozess (118). Dabei ist ein direkter Angriff dieser hochreaktiven Moleküle oder eine indirekte Wirkungsweise über die Prostaglandinbiosynthese denkbar. Prostaglandine sind entzündungsfördernd (119), und

[1] Das Ergebnis wird in Ref. (123) veröffentlicht
[2] Das Ergebnis wird in Ref. (122) veröffentlicht

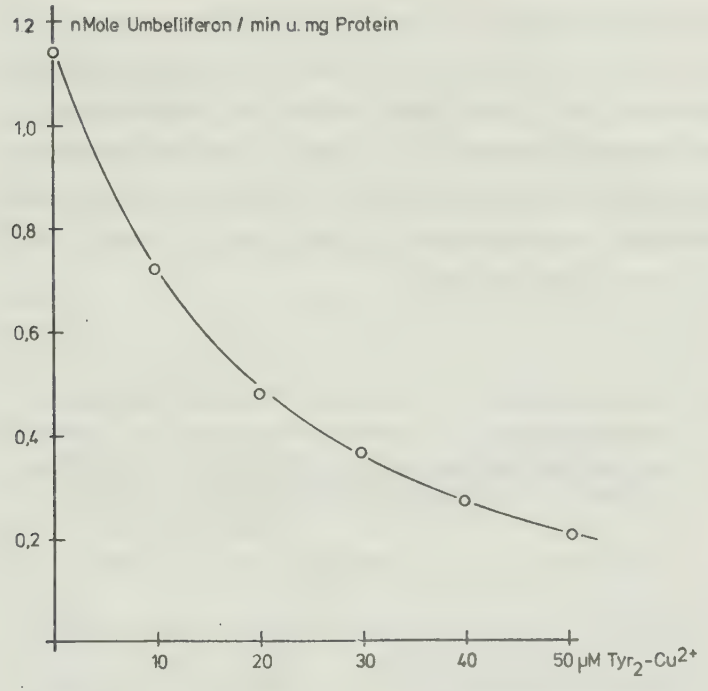


Abb. 8: Inhibierung der mikrosomalen O-Deäthylierung von 7-Äthoxycoumarin zu Umbelliferon durch Tyr_2-Cu^{2+}.

wahrscheinlich ist O_2^- an einer der Reaktionen der Prostaglandinsynthetasen beteiligt, die zu PGG_2 führen, einer Verbindung, die sowohl ein cyclisches Endoperoxid als auch eine 15-Hydroperoxygruppe enthält. Oyanagui (120) beobachtete, daß einige entzündungshemmende Pharmaka die Produktion von Superoxid in Makrophagen inhibierte, während Sorensen (121) fand, daß Cu^{2+} -Komplexe einer großen Anzahl von anti-arthritischen Verbindungen weit besser als ihre Mutterverbindungen entzündungshemmend wirkten.

Es konnte gezeigt werden (122), daß Komplexe zwischen Cu^{2+} und Aspirin oder Aspirinderivaten Superoxid Dismutaseaktivität aufweisen. Aus diesem Grunde wurde ihre Wirkungsweise in Lebermikrosomen untersucht. Tab. 5 zeigt die Inhibierung der O-Deäthylierung von 7-Äthoxycoumarin durch die Kupferkomplexe. 100% Aktivität entsprechen der Bildung von 1.1 nMolen Umbelliferon pro min und mg Protein.

Tab. 5: Inhibierung der mikrosomalen O-Deäthylierung von 7-Äthoxycoumarin zu Umbelliferon durch Cu^{2+}-Komplexe von Aspirinderivaten. 100% Aktivität entsprechen 1.1 nMolen Umbelliferon gebildet/min u. mg

Cu^{2+}-Chelat	Konzentration (µM)	%Aktivität
keiner	--	100
$(Acetylsalicylat)_2$-Cu^{2+}	10	65
$(Acetylsalicylat)_2$-Cu^{2+}	20	55
$(Acetylsalicylat)_2$-Cu^{2+}	40	50
$(Acetylsalicylat)_2$-Cu^{2+}	60	40
$(Acetylsalicylat)_2$-Cu^{2+}	80	30
$(Salicylat)_2$-Cu^{2+}	80	70
$(p\text{-}Aminosalicylat)_2$-$Cu^{2+}$	80	75
$(Diisopropylsalicylat)_2$-Cu^{2+}	80	75

3.3. Zum Mechanismus der Inhibierung durch Tyr_2-Cu^{2+} und andere O_2^- -Quencher

Die bisher geschilderten Versuche können dahingehend interpretiert werden, daß die Inhibierung der mikrosomalen Hydroxylierung auf der Reaktion der verwendeten Inhibitoren mit O_2^-

beruht, d.h., daß Superoxid eine wichtige Zwischenstufe während der Hydroxylierung in intakten Mikrosomen darstellt. Um diese Interpretation experimentell abzusichern, mußten einige Kontrollversuche durchgeführt werden. Es ist denkbar, daß die Inhibierung nicht auf der Dismutaseaktivität beruht, sondern auf Grund irgendwelcher anderer Effekte zu beobachten ist. Die Kontrollversuche wurden hauptsächlich mit Tyr_2-Cu^{2+} durchgeführt, da sich diese Verbindung als besonders guter Inhibitor erwiesen hatte.

3.3.1. Kinetische Untersuchungen des Inhibitionstyps[1] und Bindungsspektren

In Abb. 9 ist die Inhibition der Demethylierung von p-Nitroanisol zu p-Nitrophenol durch 25 µM Tyr_2-Cu^{2+} in einem doppelt reziproken Diagramm nach Lineweaver und Burk dargestellt. Es ist ersichtlich, daß V_{max}, aber nicht K_M der Reaktion durch die Gegenwart des Kupferkomplexes verändert ist. Dies deutet eine nichtkompetetive Hemmung an, d.h., der Komplex wirkt nicht als Substrat für dieselbe Bindungsstelle am aktiven Zentrum der terminalen Oxidase.
In Experimenten, die hier nicht dargestellt sind, wurde festgestellt, daß in Gegenwart von 50 µM Tyr_2-Cu^{2+} kein Cytochrom P-450-Substrat Spektrum erhalten wird, bzw. daß keine Veränderung eines Cytochrom P-450-Aminopyrin Spektrums durch Zugabe von 50 µM Tyr_2-Cu^{2+} auftrat.

---

[1] Das Ergebnis wird in Ref. (123) veröffentlicht.

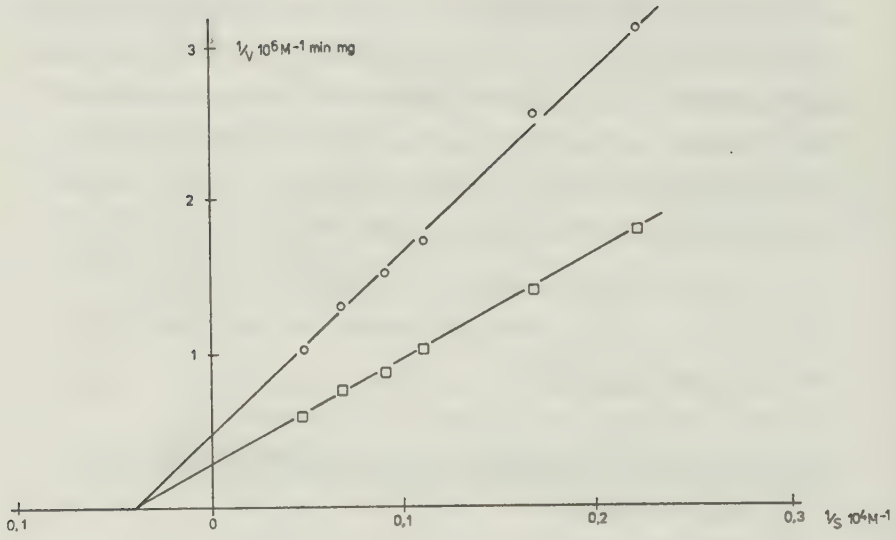


Abb. 9: Kinetische Analyse nach Lineweaver und Burk der Inhibierung der mikrosomalen O-Demethylierung von p-Nitroanisol zu p-Nitrophenol durch Tyr_2-Cu^{2+}.
□——□ Kontrolle, o——o 25 µM Tyr_2-Cu^{2+}.

3.3.2. Untersuchungen zur Bindung von Tyr_2-Cu^{2+} an mikrosomales Protein

Um eine Inhibierung der mikrosomalen Hydroxylierungsreaktion zu bewirken, muß Tyr_2-Cu^{2+} mit einer oder mehreren Komponenten der Mikrosomen in Wechselwirkung treten, die vorübergehend oder dauerhaft sein kann. Eine mögliche Bindung des Komplexes

an mikrosomales Protein wurde mit Hilfe von ^{14}C-markiertem Tyr_2-Cu^{2+} untersucht. Dazu wurden in 2 ml Puffer 3 mg Methylcholanthren-induzierte Mikrosomen, die 2 nMole Cytochrom P-448 enthielten, mit steigenden Mengen des markierten Komplexes vermischt, und nach Zentrifugation durch Messung der im Überstand verbliebenen Radioaktivität die Menge proteingebundenen Komplexes bestimmt (Tab. 6). Eine Bindung des Komplexes ist schon bei niedrigen Konzentrationen feststellbar. Inwieweit diese Bindung spezifisch an der terminalen Oxidase erfolgt, könnte durch Verwendung gleichbleibender Mengen mikrosomalen Proteins mit verschiedenem Cytochromgehalt festgestellt werden.

Tab. 6: Bindung von Tyr_2-Cu^{2+} an mikrosomales Protein (Reaktionsbedingungen: vgl. Text)

Tyr_2-Cu^{2+} zugegeben (µM)	Tyr_2-Cu^{2+} gebunden (nMole)
1.0	0.00
1.5	0.00
2.0	0.00
3.5	0.00
5.0	0.63
7.5	0.71
12.5	2.20
25.0	4.20

3.3.3. Das NADPH-regenerierende System[1]

Die für die mikrosomale Hydroxylierung benötigten Elektronen werden von NADPH geliefert. Da $NADP^+$ die NAPDH-Cytochrom c

[1] Das Ergebnis wurde in Ref. (117) veröffentlicht

Reduktase hemmt, wurde in den hier beschriebenen Versuchen, wenn nicht anders erwähnt, die Hydroxylierungsreaktion durch Zugabe von 1 mM NADPH in Gegenwart eines NADPH regenerierenden Systems gestartet. Dazu wurde routinemäßig 0.3 U Isocitrat Dehydrogenase pro ml Puffer in Gegenwart von 7 mM Isocitrat verwendet, in einigen Fällen auch 2.6 U Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase pro ml Puffer in Gegenwart von 1 mM Glucose-6-Phosphat. Unter diesen Bedingungen wurden 60 nMole NADPH pro min und ml zu NADPH reduziert (gemessen bei 340 nm). Die Gegenwart von 50 µM Tyr_2-Cu^{2+} hatte keinen Einfluß auf die Reduktionsrate von $NADP^+$. Eine Inhibierung der mikrosomalen Hydroxylierung durch Tyr_2-Cu^{2+} beruht also nicht auf einer Inhibierung des NADPH-regenerierenden Systems.

3.3.4. Transformation[1]

Cytochrom P-450 ist ein membrangebundenes Hämprotein, dessen aktives Zentrum in die Lipidphase der Mikrosomenmembran eingebettet ist. Im nativen, reduzierten Zustand absorbiert es in Gegenwart von CO bei 450 nm. Das native Protein ist relativ empfindlich gegenüber Disturbationen der Membran wie z.B. durch organische Lösungsmittel, Salze oder auch mechanische Einwirkungen und wird leicht zu einer enzymatisch inaktiven Form transformiert, die nach Reduktion in Gegenwart von CO bei 420 nm absorbiert.
Tab. 7 zeigt den Effekt einiger Verbindungen mit Superoxid Dismutaseaktivität auf die Transformation von Cytochrom P-450

---

[1] Das Ergebnis wurde in Ref. (117) veröffentlicht.

zu Cytochrom P-420. Ein Vergleich mit Tab. 4 macht deutlich, daß die Inhibierung der Hydroxylierung durch $CuSO_4$ fast vollständig und die Inhibierung durch Fe^{2+}-EDTA teilweise durch eine Transformation von Cytochrom P-450 zu Cytochrom P-420 durch diese Verbindungen erklärt werden kann. Tyr_2-Cu^{2+} und Lys-Cu^{2+} bewirken nur eine sehr geringe Transformation, die nicht proportional der Inhibierung des Hydroxylierungsprozesses ist. Die Inhibition der mikrosomalen Hydroxylierung läßt sich also nicht durch eine Transformation der terminalen Oxidase zur inaktiven Form P-420 erklären.

Tab. 7: Transformation von Cytochrom P-450 durch Verbindungen mit Superoxid Dismutaseaktivität

	Cytochrom P-450 (nMole/mg Protein)	%Transformation
kein Inhibitor	1.79	--
50 µM $CuSO_4$	1.62	9.5
2.5 µM Superoxid Dismutase	1.79	0.0
50 µM $FeSO_4$ + 100 µM EDTA	1.62	9.5
220 µM Lys-Cu^{2+}	1.70	4.1
50 µM Tyr_2-Cu^{2+}	1.73	3.4

3.3.5. NADPH-Cytochrom c Reduktase[1]

Während der Hydroxylierungsreaktion werden Elektronen von NADPH durch das Flavoprotein NADPH-Cytochrom P-450 Reduktase auf Cytochrom P-450 und wahrscheinlich auch auf Cytochrom b_5

[1] Das Ergebnis wurde in Ref. (117) veröffentlicht.

übertragen. Die Aktivität dieses Enzyms wird im allgemeinen mit Hilfe von nativem Cytochrom c gemessen, weshalb es auch NADPH-Cytochrom c Reduktase genannt wird. Eine Inaktivierung dieses Enzyms führt zur Inhibierung der mikrosomalen Hydroxylierung.

In Tab. 8 ist die Aktivität der mikrosomalen NADPH-Cytochrom c Reduktase in Gegenwart und Abwesenheit von 50 µM Tyr_2-Cu^{2+} dargestellt. Der Kupferkomplex führt zu einer geringfügigen Abnahme der Aktivität von 150 auf 140 nMolen Cytochrom c reduziert pro min und mg mikrosomalen Proteins. Das Flavoprotein produziert auch O_2^- -Radikale, die bekanntlich Cytochrom c reduzieren können. Die Dismutaseaktivität von Tyr_2-Cu^{2+} könnte mithin die etwas geringere scheinbare Aktivität des Enzyms in Gegenwart des Komplexes erklären. Selbst wenn jedoch eine siebenprozentige Inhibierung des Enzyms vorliegen würde, würde dies nicht zu einer so weitgehenden Inhibierung der Hydroxylierung führen, wie sie in Gegenwart von 50 µM Tyr_2-Cu^{2+} gefunden wird.

Tab. 8: Aktivität mikrosomaler NADPH-Cytochrom c Reduktase

NADPH (µM)	NADPH-Cytochrom c Reduktase (nMole Cytochrom c red./min u. mg)	
	-Tyr_2-Cu^{2+}	+Tyr_2-Cu^{2+}
1000 + reg.System	150	140

3.3.6. Redoxzustand der mikrosomalen Hämproteine

Eine Reihe von Experimenten wurde durchgeführt, um die Geschwindigkeit und das Ausmaß des Elektronenflusses von NADPH zu den mikrosomalen Hämproteinen in Gegenwart und Abwesenheit von Tyr_2-Cu^{2+} zu messen. Die Reduktion der terminalen Oxidase Cytochrom P-450 kann quantitativ nur anaerob in Gegenwart von CO gemessen werden. Deshalb wurden die meisten Redoxvorgänge bei dem Wellenlängenpaar 557-540 nm im Dual-Wellenlängenspektralphotometer gemessen, wobei hauptsächlich Cytochrom b_5 und zu einem geringeren Teil Cytochrom P-450 gemessen wird, oder es wurde im Split Beam Spektralphotometer ein Spektrum im Wellenlängenbereich zwischen 570 und 500 nm aufgenommen, wo ebenfalls hauptsächlich Cytochrom b_5 absorbiert.
Mit Hilfe dieser Experimente sollte geklärt werden, ob Tyr_2-Cu^{2+} die reduzierenden Reaktionsschritte inhibiert, welche Rolle es bei der Oxidation des intermediären Elektronenträgers Cytochrom b_5 spielt, und ob nicht Tyr_2-Cu^{2+} selbst als Elektronenakzeptor dient - etwa durch Reduktion zu Tyr_2-Cu^{+} und evtl. folgende Autoxidation - und dadurch die mikrosomale Hydroxylierung inhibiert.

3.3.6.1. Zeitlicher Verlauf der Redoxvorgänge an Cytochrom b_5[1]

Nachdem bereits festgestellt worden war, daß NADPH-Cytochrom c Reduktase nicht von Tyr_2-Cu^{2+} inhibiert wird, wurde die Kinetik der Reduktion von Cytochrom b_5 nach Zugabe von NADPH gemessen. Da diese Reduktion sehr schnell verläuft, wurde sie im regenerierenden Flow-Apparat gemessen. Abb. 10 zeigt die

[1] Das Ergebnis wird in Ref. (123) veröffentlicht.

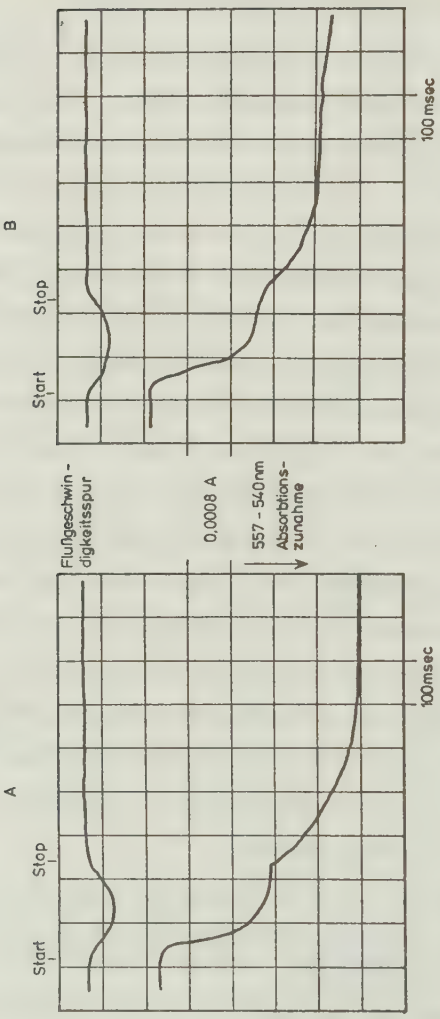


Abb. 1o: Kinetik der aeroben Reduktion mikrosomaler Pigmente
A. Kontrolle B. In Gegenwart von 5o µM Tyr_2-Cu^{2+}.

Kinetik der Reduktion mikrosomaler Pigmente, gemessen bei 557-540 nm, in Abwesenheit und Gegenwart von 50 µM Tyr_2-Cu^{2+}. Die Reaktionsgeschwindigkeit Pseudo-Erster Ordnung errechnete sich zu 331 sec^{-1} in Abwesenheit und 301 sec^{-1} in Gegenwart des Kupferkomplexes, d.h., die Reduktionsgeschwindigkeit von Cytochrom b_5 ist weniger als zehn Prozent herabgesetzt.

3.3.6.2. Ausmaß der Reduktion der Cytochrome[1]

Der steady state der mikrosomalen Pigmente wurde ebenfalls im Dual-Wellenlängenspektralphotometer bei 557-540 nm in luftgesättigtem Puffer gemessen (Abb. 11 A). Nach Zugabe von geringen Mengen NADPH in Abwesenheit eines NADPH-regenerierenden Systems wurde eine Reduktion der mikrosomalen Pigmente beobachtet, der eine Reoxidation nach Verbrauch des NADPH folgte (Kurve a). Wie schon von Estabrook et al. festgestellt (124) ist in Gegenwart eines Substrats (in diesem Falle Aminopyrin) ein niedrigerer steady state und eine schnellere Reoxidation zu beobachten (Kurve b). In Gegenwart von 50 µM Tyr_2-Cu^{2+} (Kurve c) ist der steady state noch mehr erniedrigt und die Reoxidationsrate noch mehr erhöht. Unter der Annahme, daß bei dem gewählten Wellenlängenpaar hauptsächlich Cytochrom b_5 absorbiert, und daß dessen totale Konzentration 0.55 nMole pro mg Protein beträgt, kann eine sogenannte Turnover-Zahl berechnet werden. Dazu zieht man eine Gleichung heran, die von Chance (125) entwickelt und von Modirzadeh und Kamin (105) auf mikrosomale Pigmente angewendet wurde. Die Gegenwart von Aminopyrin oder Tyr_2-Cu^{2+} erhöhte die Turnover-Zahl von Cytochrom b_5 von 0.039 sec^{-1} auf 0.055 sec^{-1} bzw. 0.079 sec^{-1}.

[1]Das Ergebnis wurde in Ref. (117) veröffentlicht.

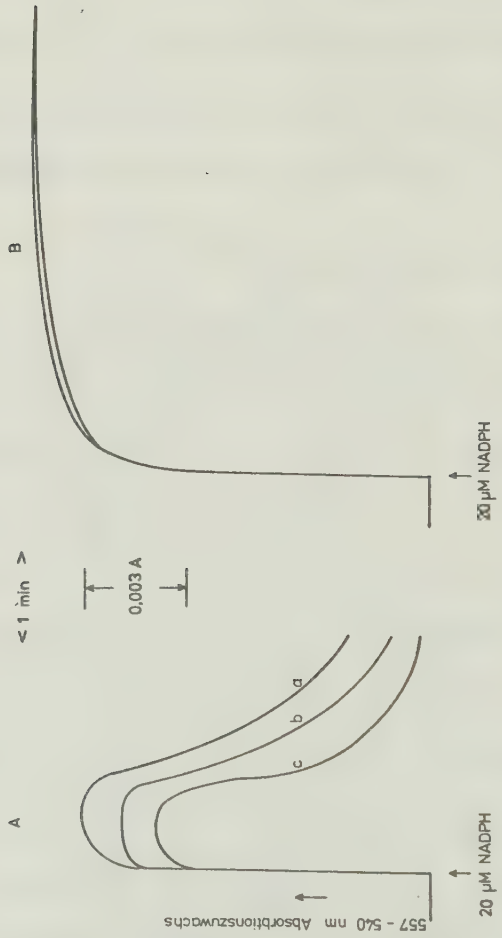


Abb. 11: Steady state-Reduktion mikrosomaler Pigmente

A. In luftgesättigtem Puffer

a. In Abwesenheit von Substrat b. In Gegenwart des Substrats Aminopyrin (1mM) c. In Gegenwart von 5o µM Tyr_2-Cu^{2+}

B. In anaerobem Puffer in Gegenwart oder Abwesenheit von 5o µM Tyr_2-Cu^{2+}.

Wird das Ausmaß der mikrosomalen Reduktion nicht in luftgesättigtem, sondern in anaerobem Puffer durchgeführt, erhält man eine Antwort auf die Frage, ob Tyr_2-Cu^{2+} die mikrosomalen Pigmente direkt oxidieren kann. Deshalb wurde der oben beschriebene Versuch anaerob in Gegenwart von 0.9 mg submitochondrialer Partikel pro ml und 3 mM Succinat durchgeführt (Fig. 11 B). In diesem Fall ist die Reduktion der mikrosomalen Pigmente dieselbe in Gegenwart oder Abwesenheit von Tyr_2-Cu^{2+} (Kontrollexperimente zeigten an, daß Zugabe von NADPH zu submitochondrialen Partikeln in Abwesenheit von Mikrosomen unter diesen Bedingungen nicht zu spektralen Änderungen führte). Diese Experimente machen deutlich, daß die Stimulierung der Oxidation der mikrosomalen Pigmente durch Tyr_2-Cu^{2+} die Gegenwart von Sauerstoff voraussetzt.
Diese Beobachtungen wurden bestätigt durch Messungen des Absorptionsspektrums von Cytochrom b_5 im Split Beam Spektralphotometer unter ähnlichen Bedingungen wie oben beschrieben, jedoch in Gegenwart eines regenerierenden Systems für NADPH (Abb12). Es ist ersichtlich, daß in Abwesenheit von Sauerstoff die Gegenwart von 50 µM Tyr_2-Cu^{2+} das Ausmaß der Reduktion von Cytochrom b_5 nicht beeinträchtigt, während der Kupferkomplex in Gegenwart von O_2 zu einer stärkeren Oxidation des Cytochroms führt.

3.3.6.3. Zeitlicher Verlauf der Reduktion von Cytochrom P-450[1]

In Abb. 13 ist die Kinetik der Reduktion von Cytochrom P-450 in Gegenwart von CO dargestellt, gemessen in einem Stopped-Flow Apparat. Zugabe von NADPH zu einer anaeroben Mikrosomen-

[1] Das Ergebnis wird in Ref. (123) veröffentlicht.

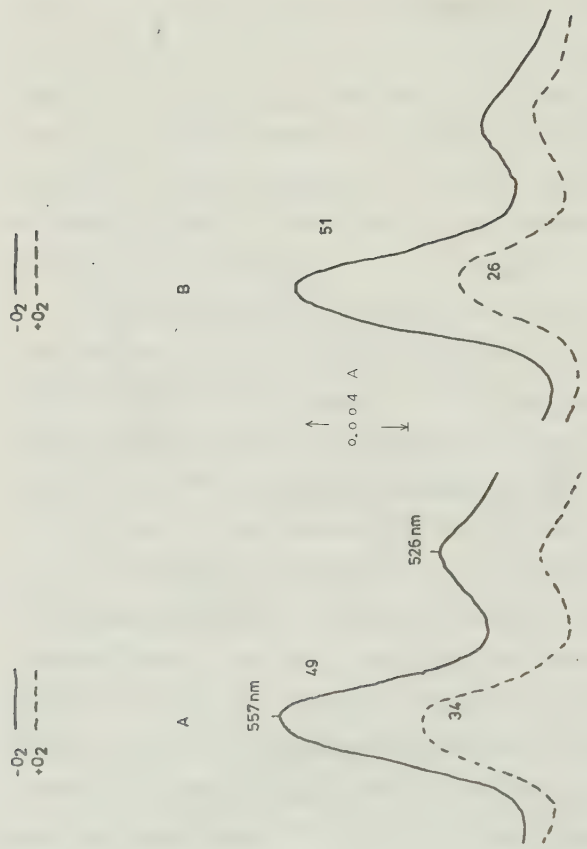


Abb. 12: Absorptionsspektrum NADPH-reduzierter mikrosomaler Pigmente in luftgesättigtem oder anaerobem Puffer A. Kontrolle B. In Gegenwart von 5o µM Tyr_2-Cu^{2+} Die Zahlen neben den Kurven geben das relative Ausmaß der Reduktion bei 557 nm an.

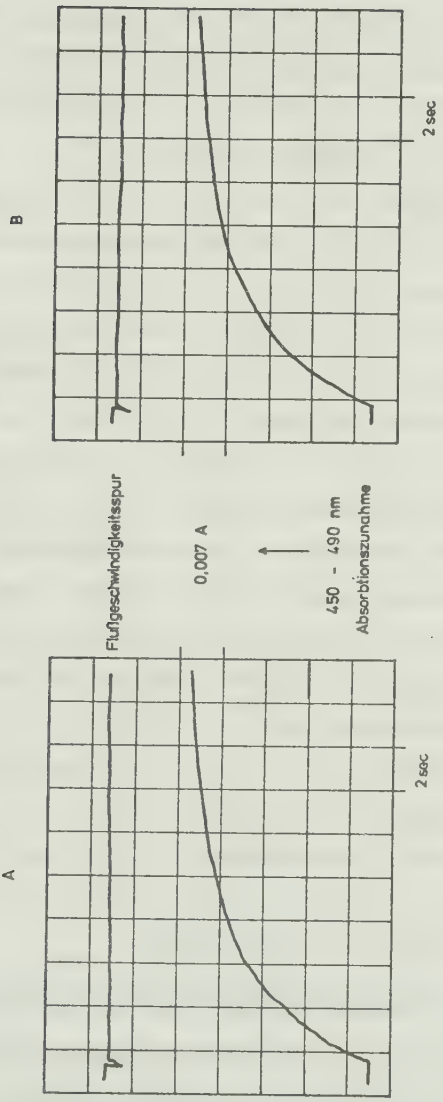


Abb. 13: Kinetik der Reduktion von Cytochrom P-450

A. Kontrolle B. In Gegenwart von 50 µM Tyr_2-Cu^{2+}.

suspension, die mit CO begast worden war, führt zu einer Absorption bei 450-490 nm, welche die Kinetik der Reduktion anzeigt. Die Halbwertszeit der Reduktion (etwa drei Sekunden) wird von 50 µM Tyr_2-Cu^{2+} nicht verändert.

Diese Untersuchungen zum Redoxzustand der mikrosomalen Hämproteine in Gegenwart und Abwesenheit des Kupferkomplexes zeigen, daß der Komplex selbst nicht als Elektronenakzeptor dient. Wäre dies der Fall, so müßte das Ausmaß der anaeroben Reduktion der mikrosomalen Pigmente (3.3.6.2.) nach Zugabe von 20 µM NADPH in Gegenwart von 50 µM Tyr_2-Cu^{2+} verringert sein. Eine verstärkte Reoxidation der Pigmente ist nur in Gegenwart von Sauerstoff (3.3.6.2.) festzustellen, d.h., nur in diesem Fall ist der Komplex in der Lage, Elektronen von dem System abzuziehen, ein Befund, der durch die Superoxid Dismutaseaktivität des Komplexes erklärt werden kann. Die Inhibierung der mikrosomalen Hydroxylierung durch den Komplex läßt sich auch nicht mit einer Beeinflussung der reduzierenden Reaktionswege begründen. Weder die Reduktionsgeschwindigkeit von Cytochrom b_5 noch diejenige von Cytochrom P-450 ist in Gegenwart des Komplexes wesentlich verlangsamt (3.3.6.1. und 3.3.6.3.).

3.3.7. Sauerstoffaufnahme der Mikrosomen[1]

Die dargestellten Experimente zeigen, daß in Gegenwart von Tyr_2-Cu^{2+} die Oxidation der mikrosomalen Pigmente beschleunigt ist, jedoch nur dann, wenn Sauerstoff vorhanden ist. Die reduzierenden Reaktionswege sind vom Kupferkomplex nicht be-

[1] Das Ergebnis wird in Ref. (123) veröffentlicht.

rührt. Diese Befunde legen den Schluß nahe, daß Tyr_2-Cu^{2+} auf Grund seiner Dismutaseaktivität die mikrosomale Hydroxylierung inhibiert.

Falls Tyr_2-Cu^{2+} während der mikrosomalen Hydroxylierung als Dismutase wirkt, so sollte in seiner Gegenwart die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme verringert sein: Während der eng gekoppelten Hydroxylierung wird für jedes Elektronenpaar ein Molekül Wasser und ein Molekül hydroxyliertes Substrat unter Aufnahme von einem Molekül Sauerstoff gebildet. Wenn in Gegenwart von Tyr_2-Cu^{2+} wegen der Dismutation von zwei Superoxidanionen zu H_2O_2 und O_2 keine Hydroxylierung abläuft, wird die Netto-Sauerstoffaufnahme durch die Dismutation verringert. Darüberhinaus wird das gebildete H_2O_2 von Katalase, die in den Mikrosomen vorhanden ist, ebenfalls zu O_2 oxidiert. Eine Anzahl von Experimenten wurde durchgeführt, um die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme durch Mikrosomen nach Zugabe von NADPH in Gegenwart und Abwesenheit von Tyr_2-Cu^{2+} zu untersuchen. Tatsächlich hemmt Tyr_2-Cu^{2+} die Substratstimulierte Sauerstoffaufnahme der Mikrosomen. Abb. 14 zeigt die Inhibition der Sauerstoffaufnahme in Gegenwart des Kupferkomplexes. Sie beträgt in diesem Falle etwa 46%.

3.3.8. Wirkung auf den Synergismus von NADPH und NADH

Untersuchungen von Estabrook (126) führten zu der Annahme, daß auch NADH *via* Cytochrom b_5 als Donor des zweiten Elektrons während mikrosomaler Hydroxylierung wirken kann. Diese Annahme beruht u.a. darauf, daß NADH in Gegenwart limitierender Mengen NADPH die Hydroxylierung stark stimuliert, während es in

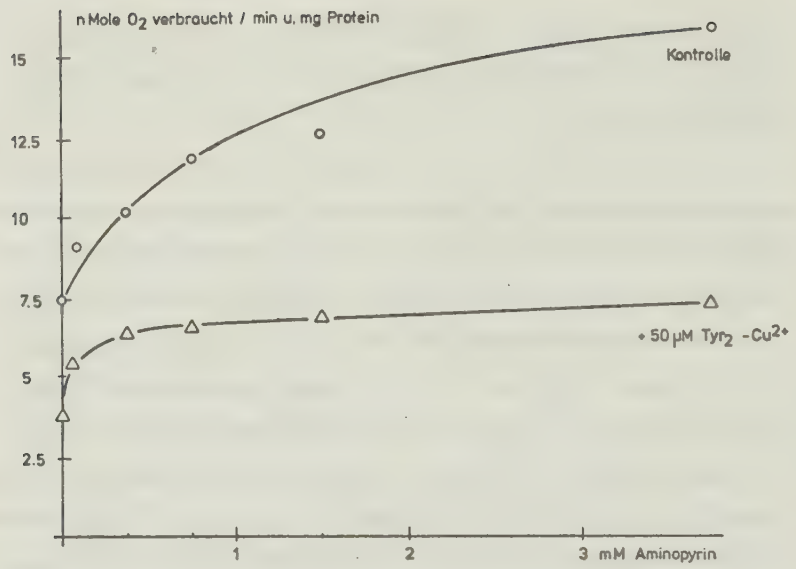


Abb. 14: Substratstimulierte Sauerstoffaufnahme durch Mikrosomen und deren Inhibierung durch 5o µM Tyr_2-Cu^{2+}.

Abwesenheit von NADPH die Hydroxylierung nicht ablaufen läßt. Es liegt also ein Synergismus zwischen NADPH und NADH vor, wenn NADPH in limitierenden Mengen vorhanden ist. Nach Estabrook soll das zweite Elektron jedoch auch in einer langsameren Reaktion von NADPH-Cytochrom P-450 Reduktase geliefert werden können.

In Tab. 9 ist der Synergismus zwischen NADPH und NADH während der mikrosomalen Demethylierung von p-Nitroanisol zu p-Nitrophenol dargestellt. 7.5 µM NADPH in Gegenwart eines NADPH-regenerierenden Systems führten zu einer Demethylierungsrate

0.29 nMolen p-Nitrophenol pro min und mg Protein, die durch Zugabe von 100 µM NADH auf 0.45 nMole pro min und mg gesteigert wurde (ca. 1.5fache Steigerung). Wurde dasselbe Experiment in Gegenwart von 35 µM Tyr_2-Cu^{2+} durchgeführt, so führte die Zugabe von NADH zu einer vierfachen Steigerung.

Tab. 9: Synergismus von NADPH und NADH während der mikrosomalen Hydroxylierung und Wirkung von 35 µM Tyr_2-Cu^{2+}

	Hydroxylierungsrate	
	a.) TKM-Puffer	b.) TKM-Puffer + 35 µM Tyr_2-Cu^{2+}
7.5 µM NADPH + reg. System	0.29	0.065
+ 100 µM NADPH	0.45	0.26
Stimulation	1.5-fach	4-fach

Der Synergismus konnte durch die hier beschriebenen Versuche bestätigt werden. Interessant ist dabei, daß NADH in Gegenwart von Tyr_2-Cu^{2+} mehr stimulierte als in dessen Abwesenheit. Diese Befunde können folgendermaßen interpretiert werden (Abb.15):

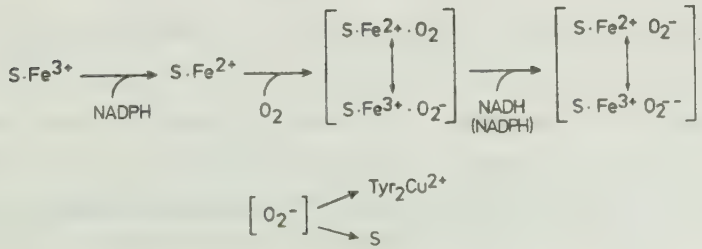


Abb. 15: Hypothetische Wirkungsweise von Tyr_2-Cu^{2+} während des Synergismus von NADPH und NADH. Erläuterung siehe Text.

Da die steady state-Konzentration des Komplexes $S \cdot Fe^{3+}O_2^{--}$ $\longleftrightarrow$ $S \cdot Fe^{2+}O_2^{-}$ in Gegenwart geringer Mengen NADPH niedrig ist, kann O_2^- leichter durch Tyr_2-Cu^{2+} abgefangen werden als in Gegenwart von NADPH und NADH: die Zugabe des zweiten Elektrons ist durch NADH erleichtert, die steady state-Konzentration von $S \cdot Fe^{3+}O_2^{--}$ $\longleftrightarrow$ $S \cdot Fe^{2+}O_2^{-}$ erhöht, und das Substrat kann mit Tyr_2-Cu^{2+} eher um O_2^- konkurieren. Diese Interpretation ist jedoch recht spekulativ, da die kinetischen Konstanten der Reaktionen nicht bekannt sind.

3.3.9. Zur Lokalisierung der Inhibierung durch Tyr_2-Cu^{2+}

Neuere Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Ernster (113, 127) haben ergeben, daß Mikrosomen nicht nur in Gegenwart von NADPH und molekularem Sauerstoff hydroxylieren. Partiell gereinigtes Cytochrom P-450 oder intakte Mikrosomen hydroxylieren auch in Abwesenheit von NADPH und Sauerstoff, wenn oxidierende Substanzen wie Perjodat, Chlorit, H_2O_2 oder organische Peroxide als Sauerstoffdonatoren verwendet werden. Bei Zugabe dieser Substanzen kommt es zu einer vorübergehenden Bildung einer Verbindung, die bei 440 nm ein Absorbtionsmaximum besitzt und in Analogie zu einem ähnlich absorbierenden Derivat von Katalase "Ferryl Intermediat" genannt wird. In diesem Intermediat soll das Häm-Eisen im vierwertigen Zustand, mit

einem Sauerstoffatom verbunden, vorliegen. Diese Zwischenstufe stellt wahrscheinlich die eigentliche sauerstoffübertragende Spezies bei der Hydroxylierung dar.

In Abb. 16 ist ein Mechanismus der Substrathydroxylierung dargestellt, wie er von Ernster und Mitarbeitern vorgeschlagen wird. In der NADPH-abhängigen Reaktion bindet Cytochrom P-450 das Substrat und übernimmt darauf ein Elektron von NADPH unter Bildung eines Fe^{2+}-Komplexes, der Sauerstoff bindet und ein zweites Elektron aufnimmt. Dies führt zur Bildung eines Fe^{2+}-O_2^- Komplexes, der in Resonanz mit einem Fe^{3+}-Hydroperoxykomplex steht. Wegen seiner geringen Stabilität zerfällt dieser Komplex zu Wasser und einer Verbindung, die aus Fe^{3+} komplexiert mit einem Sauerstoffatom besteht und in Resonanz mit dem Ferrylion-Komplex $Fe^{4+}O^-$ steht. Diese Spezies zerfällt unter Bildung eines hydroxylierten Substrats und Regenerierung des Enzyms in der Fe^{3+}-Form. Oxidierende Verbindung wie Perjodat, Chlorit oder Peroxide sollen nach Ernster mit der Fe^{3+}-Form von Cytochrom P-450 direkt zum Ferrylion reagieren.

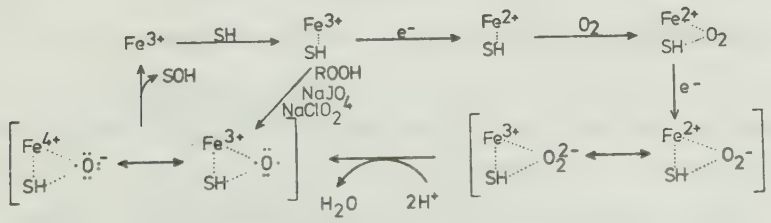


Abb. 16: Hypothetischer Reaktionsmechanismus der Substrathydroxylierung, nach Ref. (113).

Eine andere Möglichkeit, in Abwesenheit von molekularem Sauerstoff und NADPH zu hydroxylieren, besteht in der Verwendung sogenannter Oxendonatoren wie Jodosobenzol oder 3-Chlorperbenzoesäure. Diese Verbindungen übertragen direkt ein Sauerstoffatom auf Cytochrom P-450 in der Fe^{3+}-Form, ohne die Beteiligung von diatomarem Sauerstoff.
Die Reaktion der erwähnten oxidierenden Verbindungen mit dem Substrat läuft spezifisch an Cytochrom P-450 ab (113, 127).
Die unter 3.3.6. bis 3.3.8. dargestellten Versuche ließen den Schluß zu, daß die inhibierende Wirkung von Tyr_2-Cu^{2+} während der mikrosomalen Hydroxylierung an oder in der Nähe von Cytochrom P-450 zu suchen ist. Durch Verwendung von Cumolhydroperoxid sollte näheres über den Ort der Inhibierung durch Tyr_2-Cu^{2+} erfahren werden,und die Verwendung eines Oxendonators sollte weiteren Aufschluß über die spezifische Wirkung des Kupferkomplexes geben.

3.3.9.1. Inhibierung der Cumolhydroperoxid-abhängigen Hydroxylierung durch Quencher von O_2^-.Die Bildung von O_2^- [1]

In Tab. 10 ist die Inhibierung der Cumolhydroperoxid-induzierten Demethylierung von p-Nitroanisol zu p-Nitrophenol durch Tiron und Tyr_2-Cu^{2+} dargestellt. Sowohl Anfangsrate als auch Ausmaß der Produktbildung sind bei Anwesenheit von O_2^--Quenchern erniedrigt. Die Inhibierung beruht nicht auf einer Dekomposition von Cumolhydroperoxid durch die Quencher, wie in Kontrollversuchen spektrophotometrisch bei 250 nm gemessen wurde.

[1] Das Ergebnis wird in Ref. (123) veröffentlicht.

Tab. 10: Inhibierung der Cumolhydroperoxid-abhängigen mikrosomalen Demethylierung von p-Nitroanisol zu p-Nitrophenol durch Tiron und Tyr_2-Cu^{2+}

	Anfangsrate (nMole p-Nitrophenol gebildet/min u. mg)	Ausmaß (nMole p-Nitrophenol gebildet/min)
Kontrolle	2.36	1.72
+ 12.5 mM Tiron	0.86	0.45
Kontrolle	3.4	1.7
+ 50 µM Tyr_2-Cu^{2+}	1.5	0.4

Tab. 11 zeigt, daß unter diesen experimentellen Bedingungen, d.h. bei der Zugabe von Cumolhydroperoxid, Superoxid Radikale gebildet werden, die durch Bildung von Nitroform aus Tetranitromethan nachgewiesen werden (Tab. 11 a). Die Bildung der Superoxid Radikale wird durch Tyr_2-Cu^{2+} inhibiert. In Gegenwart des Substrats p-Nitroanisol ist ein freies Auftreten von O_2^- nicht meßbar (Tab. 11b), was darauf hindeutet, daß

Tab. 11: Bildung von Superoxid Radikalen in Mikrosomen nach Zugabe von Cumolhydroperoxid

	Kontrolle	+ 50 µM Tyr_2-Cu^{2+}
a. Bildung von O_2^- (nMole Nitroform/min u.mg)	4.7	2.4
b. Bildung von O_2^- (nMole Nitroform/min u.mg) in Gegenwart von 3 mM p-Nitroanisol	0.0	0.0

O_2^- jetzt zur Substrathydroxylierung benutzt wird. Eine kinetische Analyse der Bildung der bei 440 nm absorbierenden Spezies nach Zugabe von Cumolhydroperoxid wurde im Flow-Apparat durchgeführt. Abb. 17 zeigt, daß die Bildungsrate dieser Spezies durch die Gegenwart von 50 µM Tyr_2-Cu^{2+} nicht veränderbar ist, während das Ausmaß der Bildung zu etwa 50% inhibiert wird. Dies läßt vermuten, daß das verringerte Ausmaß der Bildung der 440 nm-Spezies die Folge einer Abnahme eines notwendigen Vorläufers dieser Spezies, vermutlich des Superoxidanions, ist. Die Bildung der 440 nm-Spezies ist zweiphasisch mit einer Geschwindigkeitskonstanten $k = 6.9 sec^{-1}$ für die schnelle, und $k = 0.19\ sec^{-1}$ für die langsame Phase. Weder die schnelle noch die langsame Konstante wird durch die Gegenwart von 50 µM Tyr_2-Cu^{2+} verändert (Abb. 18). Auch in Gegenwart von NADPH wird eine zweiphasische Reduktion von Cytochrom P-450 beobachtet (83, 128). Extrapoliert man die langsame Phase der Bildung der 440 nm-Spezies nach Zugabe von Cumolhydroperoxid in der halblogarithmischen Auftragung (Fig. 18), so findet man, daß 54% der Komponente langsam reagiert. Ähnlich fanden Gigon und Mitarbeiter (128), daß nach Zugabe von NADPH 54% des gesamten Cytochrom P-450 langsam reagieren. Dies ist ein Hinweis dafür, daß die bei 440 nm beobachtete Spezies tatsächlich Cytochrom P-450 darstellt.

Die Bildung von Superoxidradikalen in NADPH-supplementierten Mikrosomen ist schon früher nachgewiesen worden, aber ihre Bedeutung für den Mechanismus der Hydroxylierung konnte nicht genau untersucht werden, da NADPH-Cytochrom c Reduktase beträchtliche Mengen O_2^- produziert. Da jedoch in den hier beschriebenen Experimenten Cumolhydroperoxid nur mit Cytochrom

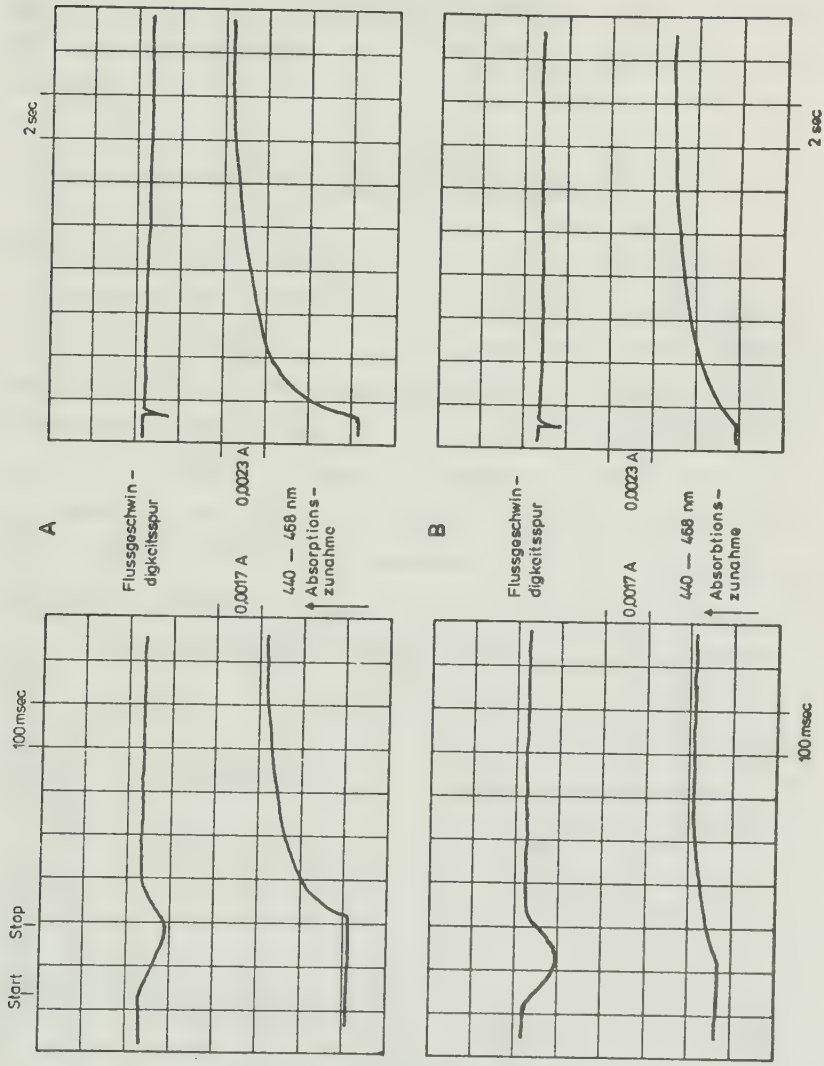


Abb. 17: Kinetik der Bildung des Ferryl-Intermediats in Mikrosomen nach Zugabe von Cumolhydroperoxid
A. Kontrolle B. In Gegenwart von 5o µM Tyr_2-Cu^{2+}.

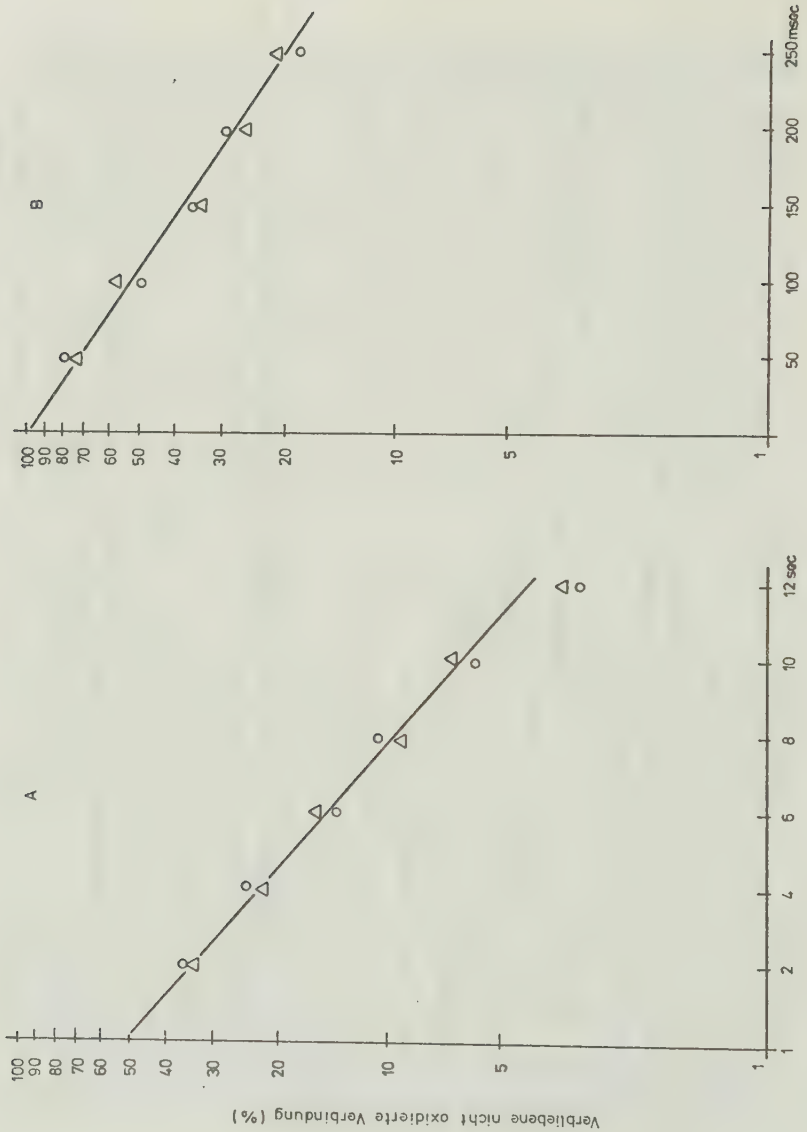


Abb. 18: Halblogarithmische Auftragung der Abb. 17

A. Langsame Phase B. Schnelle Phase

△——△ Kontrolle, o——o 50 µM Tyr_2-Cu^{2+}.

P-450 reagiert, ist es sehr wahrscheinlich, daß O_2^- an diesem Cytochrom gebildet wird und in den Hydroxylierungsmechanismus eingeht.

3.3.9.2. Hydroxylierung mit einem Oxendonor

Abb. 19 zeigt das Ausmaß der mikrosomalen Dealkylierung von 7-Äthoxycoumarin zu Umbelliferon in Abwesenheit und Gegenwart steigender Mengen Tyr_2-Cu^{2+} nach Zugabe des Oxendondors 3-Chlorperbenzoesäure. Konzentrationen von Tyr_2-Cu^{2+}, die die NADPH-abhängige Hydroxylierung (vgl. Abb. 8) fast vollständig inhibieren, bewirken nur eine geringfügige ($< 10\%$) Inhibition in Gegenwart des Oxendondors. Die O_2^- -Produktion nach Zugabe von 3-Chlorperbenzoesäure, gemessen durch Nitroformbildung wie für Cumolhydroperoxid unter 3.3.9.1. beschrieben, betrug 0.19 n Mole pro min und mg, also weniger als 5% der dort gemessenen Rate.

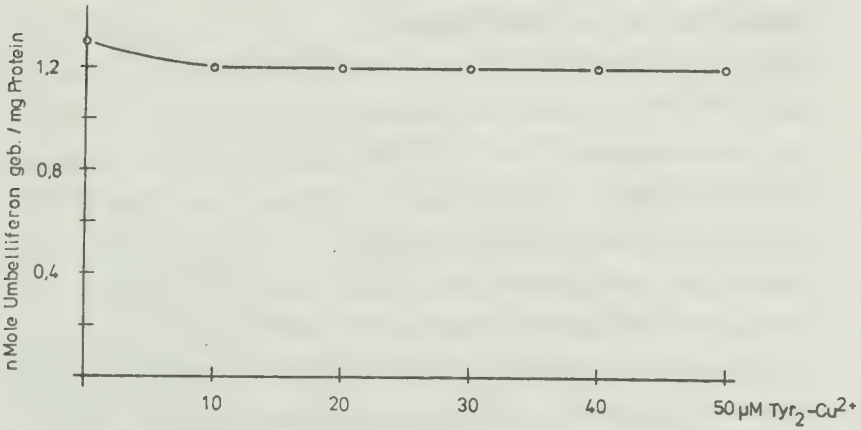


Abb. 19: Mikrosomale O-Deäthylierung von 7-Äthoxycoumarin zu Umbelliferon in Abwesenheit von NADPH mit Hilfe des Oxendonors 3-Chlorperbenzoesäure.

3.4. Zur Beteiligung von OH· am Mechanismus der Cytochrom P-450-abhängigen mikrosomalen Hydroxylierung

OH· Radikale sind sehr reaktiv und wenig selektiv. In Modellreaktionen sind sie nicht in der Lage, aliphatische CH-Bindungen zu hydroxylieren, Epoxide zu bilden oder Dihydrodiole an Doppelbindungen zu formen (129). Auch der typische "NIH-shift" bei der Hydroxylierung am Aromaten ist nicht zu beobachten (99). Deshalb wurde die Beteiligung von OH· am Mechanismus der mikrosomalen Hydroxylierung vielfach bezweifelt. Ferner ist es nicht möglich, die Stöchiometrie der Hydroxylierungsreaktion (Substrat + 2 Elektronen + O_2 ⟶ hydroxyliertes Substrat + Wasser) mit der Beteiligung von OH· in Einklang zu bringen.

Es gibt jedoch eine Anzahl von Modellreaktionen, in denen mit Hilfe von OH· Hydroxylierungen und Dealkylierungen, also Reaktionen, die für Mikrosomen typisch sind, durchgeführt werden. So dealkyliertOH·Phenacetin (130) und hydroxyliert Chinolin zu 3-HO-Chinolin (131), p-Coumarinsäure zu Kaffeesäure (95), p-Kresol zu 4-Methylcatechol und 4-Nitrophenol zu 4-Nitrocatechol (94). Die Stöchiometrie der mikrosomalen Hydroxylierung ist nur für wenige Substrate gesichert (79), und es ist bekannt, daß Mikrosomen H_2O_2 und O_2^- bilden, d.h. potentielle Vorläufer von OH·. Eine weitere Möglichkeit der Bildung von OH· ist die Reaktion von Fe^{2+}, z.B. reduziertem Cytochrom P-450, mit H_2O_2. Daher scheint es durchaus möglich, daß OH· wenigstens an einigen mikrosomalen Hydroxylierungsreaktionen beteiligt ist.

OH· Radikale lassen sich in biologischem Material nicht direkt

nachweisen. Ihre Halbwertszeit und ihre steady-state-Konzentrationen sind zu gering, als daß man etwa Elektronenspinresonanz zu ihrer direkten Bestimmung heranziehen könnte. Spektroskopische Nachweise, die z.B. während der Pulsradiolyse benützt werden, scheiden ebenfalls aus. Zum Nachweis von OH˙ Radikalen ist man daher auf indirekte Messungen angewiesen. Wird etwa eine Reaktion von Verbindungen, die mit OH˙ reagieren, inhibiert, so ist dies ein Hinweis auf die Beteiligung der Radikale an dieser Reaktion.
Im folgenden wird die Inhibierung einiger Cytochrom P-450-abhängiger Hydroxylierungsreaktionen durch Quencher von OH˙ und einige Untersuchungen zum Mechanismus der Inhibierung beschrieben.

3.4.1. Inhibierung NADPH-abhängiger Hydroxylierungen an Cytochrom P-450 durch Quencher von OH˙ Radikalen

In den Abb. 20 bis 23 ist die Inhibierung der NADPH-abhängigen Demethylierung von p-Nitroanisol zu p-Nitrophenol an Cytochrom P-450 durch Methional (41), t-Butanol (37), Dimethoxyäthan (39), und Äthanol (40) dargestellt. Diese Verbindungen reagieren schnell und recht spezifisch mit OH˙ Radikalen. Polare Quencher wie Formiat oder Mannit inhibieren selbst bei hohen Konzentrationen (100 mM) nur wenig (Tab. 12).
In Tab. 13 ist der Inhibierung der p-Nitrophenolbildung durch einige OH˙-Reagenzien diejenige der Umbelliferonbildung gegenübergestellt.

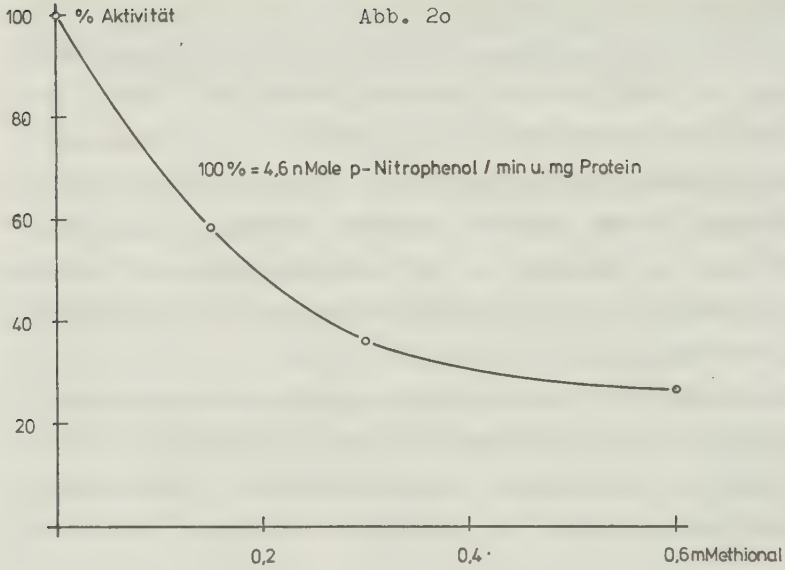

100
% Aktivität
80
60
40
20
100 % = 4,6 n Mole p-Nitrophenol / min u. mg Protein
0,2
0,4
0,6 mMethional

Abb. 2o

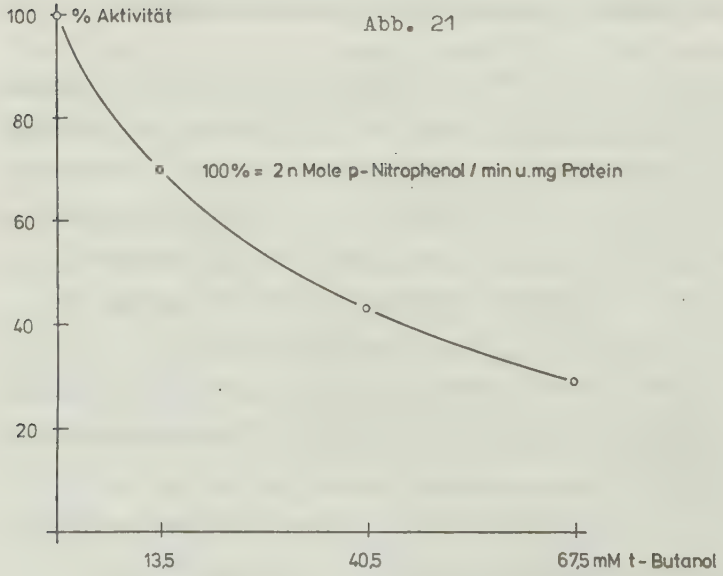

100
% Aktivität
80
60
40
20
100 % = 2 n Mole p-Nitrophenol / min u. mg Protein
13,5
40,5
67,5 mM t-Butanol

Abb. 21

Abb. 22

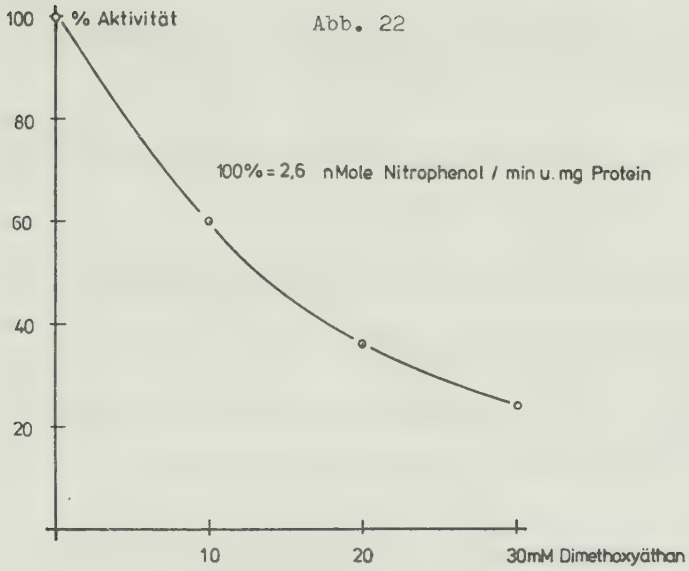

100
80
60
40
20
% Aktivität
100% = 2,6 nMole Nitrophenol / min u. mg Protein
10
20
30mM Dimethoxyäthan

Abb. 23

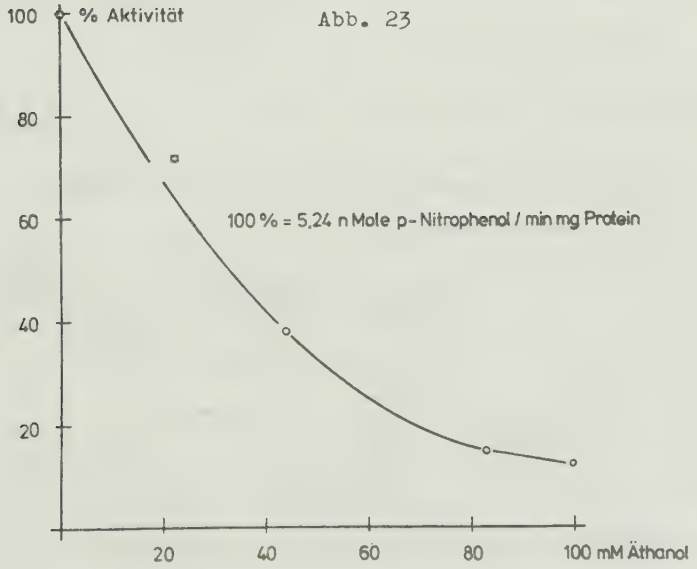

100
80
60
40
20
% Aktivität
100 % = 5,24 n Mole p-Nitrophenol / min mg Protein
20
40
60
80
100 mM Äthanol

Abb. 2o: Mikrosomale O-Demethylierung von p-Nitroanisol zu p-Nitrophenol: Inhibierung durch Methional.

Abb. 21: Mikrosomale O-Demethylierung von p-Nitroanisol zu p-Nitrophenol: Inhibierung durch t-Butanol.

Abb. 22: Mikrosomale O-Demethylierung von p-Nitroanisol zu p-Nitrophenol: Inhibierung durch Dimethoxyäthan.

Abb. 23: Mikrosomale O-Demethylierung von p-Nitroanisol zu p-Nitrophenol: Inhibierung durch Äthanol.

Tab. 12: Mikrosomale Demethylierung von p-Nitroanisol. Inhibierung durch Formiat und Mannit

Kontrolle	2.18	nMole p-Nitroanisol demethyliert/min u. mg
+ 100 mM Formiat	70%	Aktivität
+ 100 mM Mannit	93%	Aktivität

Tab. 13: Vergleich der mikrosomalen Dealkylierung von p-Nitroanisol und 7-Äthoxycoumarin. Inhibierung durch Quencher von OH·

	nMole p-Nitroanisol/ min u. mg	%Kontroll-aktivität	nMole 7-Äthoxyc./ min u.mg	%Kontroll-aktivität
Kontrolle	1.52	--	0.65	--
+ 0.5 mM Methional	0.79	52	0.25	38
+ 25 mM Dimethoxyäthan	0.90	59	0.47	72
+ 67.5 mM t-Butanol	0.79	52	0.30	46

Tab. 14 zeigt die Cumolhydroperoxid-abhängige Dealkylierung von p-Nitroanisol an Cytochrom P-450 und ihre Inhibition durch einige OH·-Quencher. Interessant ist hierbei, daß t-Butanol in diesem Falle kaum inhibiert.

Tab. 14: Cumolhydroperoxid-abhängige mikrosomale Demethylierung von p-Nitroanisol. Inhibierung durch Quencher von OH·

	Anfangsrate (nMole/min u.mg)	%Kontrollaktivität	Ausmaß nach 1 min (nMole/mg)	%Kontrollaktivität
Kontrolle	2.36	--	1.72	--
+ 0.5 mM Methional	0.77	33	0.54	31
+67.5 mM t-Butanol	2.14	91	1.32	77
+50 mM Äthanol	1.12	47	0.71	41
+27.5 mM Dimethoxyäthan	1.65	70	0.74	43

3.4.2. Zum Mechanismus der Inhibierung durch OH·-Quencher

Offensichtlich wird die Cytochrom P-450-abhängige mikrosomale Hydroxylierung durch Verbindungen gehemmt, die mit OH· reagieren. Um auf eine Beteiligung dieser Radikale am Reaktionsmechanismus schließen zu können, wurde ähnlich wie im Fall von O_2^- der Mechanismus der Inhibierung näher untersucht.

Zunächst wurden Kontrollversuche durchgeführt, ob eine Transformation von Cytochrom P-450 zur inaktiven Form Cytochrom P-420 durch die verwendeten Quencher vorliegt. Dies war jedoch nicht der Fall, ebensowenig wie eine Inaktivierung des NADPH-regenerierenden Systems (Resultate nicht gezeigt).

3.4.2.1. Aktivität der NADPH-Cytochrom c Reduktase in Gegenwart von OH°-Quenchern

Keiner der verwendeten OH°-Quencher inhibierte das mikrosomale Enzym NADPH-Cytochrom c Reduktase. Es wurde jedoch eine Stimulierung durch Methional festgestellt. Tab. 15 zeigt diese Stimulierung durch 0.5 mM Methional, gemessen sowohl durch Reduktion von Cytochrom c als auch durch Oxidation von NADPH. In Abb. 24 ist die Stimulierung der Reduktaseaktivität in Abhängigkeit der Methionalkonzentration dargestellt. Eine derartige Stimulierung ist bisher in der Literatur noch nicht beschrieben worden.

Tab. 15: Stimulierung der mikrosomalen NADPH-Cytochrom c Reduktase durch Methional

	in TKM-Puffer	in TKM-Puffer +0.5 mM Methional
nMole Cytochrom c reduziert/min u.mg	103	313
nMole NADPH oxidiert/min u.mg	98	276

Tab. 16 zeigt die Wirkung einiger schwefelhaltiger Verbindungen und Aldehyde auf NADPH-Cytochrom c Reduktase (die Enzymaktivität wurde in methylcholanthren-induzierten Mikrosomen gemessen; dies ist wahrscheinlich der Grund für die relativ niedrigen Aktivitäten). Es ist ersichtlich, daß einzig Methional die Aktivität des Enzyms stimuliert.

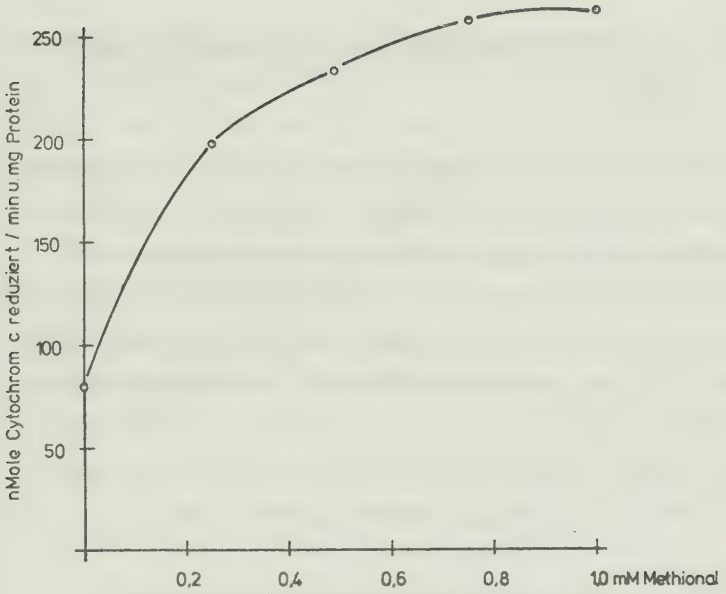


Abb. 24: Stimulierung der mikrosomalen NADPH-Cytochrom c Reduktase-Aktivität in Abhängigkeit der Methional-konzentration.

Tab. 16: Aktivität mikrosomaler NADPH-Cytochrom c Reduktase

Reaktionsansatz	nMole Cytochrom c reduziert/min u. mg
Kontrolle	32
1 mM Methional	48
10 mM Cystein	6
10 mM Glutathion	7
25 mM Mercaptoäthanol	3
12 mM Formaldehyd	20
12 mM Salicylaldehyd	30

3.4.2.2. Turnover-Zahl von Cytochrom b_5 in Gegenwart von Methional

Ähnlich wie unter 3.3.6.2. beschrieben, wurde auch der Effekt von Methional auf die Redoxvorgänge an Cytochrom b_5 nach Zugabe limitierender Mengen von NADPH bestimmt. In Gegenwart von Methional war das Ausmaß der steady-state-Reduktion erniedrigt, und die Reoxidation beschleunigt. Die Turnover-Zahl stieg von 0.017 in Abwesenheit auf 0.068 in Gegenwart von 0.5 mM Methional. Diese Tatsache ist besonders bemerkenswert, wenn man bedenkt, daß Methional die NADPH-Cytochrom c Reduktase, die auch Cytochrom b_5 reduziert, stimuliert.

3.4.2.3. Kinetische Untersuchungen zur Inhibition durch OH°-Quencher

Eine mögliche Erklärung für die Inhibition der Cytochrom P-450-abhängigen mikrosomalen Hydroxylierung durch die beschriebenen OH°-Quencher ist die Annahme einer Kompetition zwischen den Substraten p-Nitroanisol bzw. 7-Äthoxycoumarin und den Quenchern. Eine derartige Hemmung sollte sich durch eine kinetische Analyse nach Lineweaver und Burk feststellen lassen. Die Interpretation einer solchen Analyse ist jedoch dadurch erschwert, daß sich in der mikrosomalen Membran eine Anzahl von Cytochromen P-450 befindet, die sich möglicherweise in ihren katalytischen Eigenschaften unterscheiden. Eine nichtkompetetive Hemmung zeigt allein also nicht schlüssig, daß der Quencher nicht doch ein Substrat der Gesamtreaktion darstellt.

Die Abb. 25 bis 27 zeigen in doppelt reziproker Auftragung nach Lineweaver und Burk die Inhibition der p-Nitrophenolbildung durch Methional, t-Butanol und Dimethoxyäthan. Offensichtlich ist die nichtinhibierte Reaktion durch hohe Substratkonzentrationen stimuliert. Dimethoxyäthan scheint bei hohen Substratkonzentrationen kompetetiv zu inhibieren, während t-Butanol bei niedrigen Konzentrationen von p-Nitroanisol einen nicht-kompetetiven Hemmtyp anzeigt. Im Falle von Methional bleibt der Typ der Hemmung im unklaren.

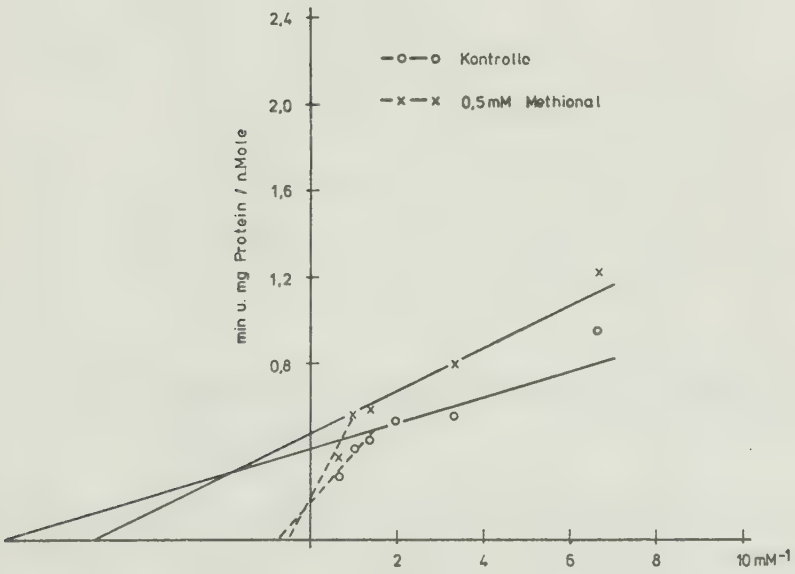


Abb. 25: Kinetische Analyse nach Lineweaver und Burk der mikrosomalen O-Demethylierung von p-Nitroanisol: Inhibierung durch Methional.

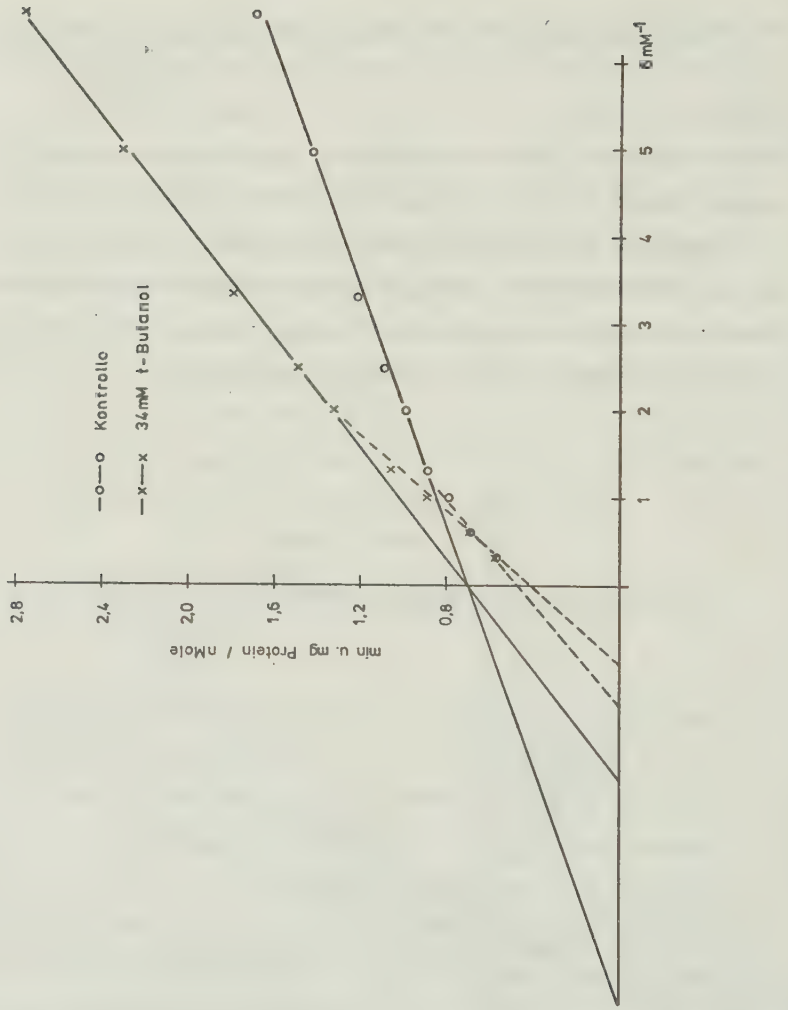


Abb. 26: Kinetische Analyse nach Lineweaver und Burk der mikrosomalen O-Demethylierung von p-Nitroanisol: Inhibierung durch t-Butanol.

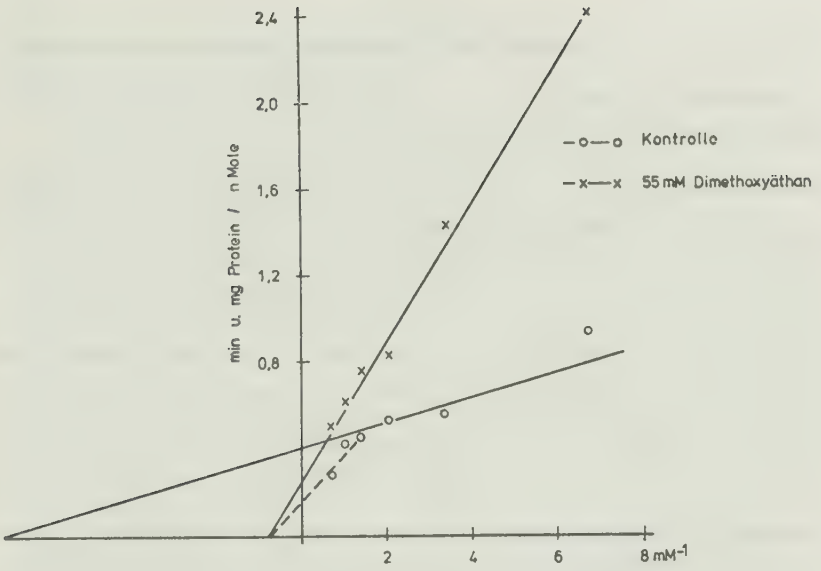


Abb. 27: Kinetische Analyse nach Lineweaver und Burk der mikrosomalen O-Demethylierung von p-Nitroanisol: Inhibierung durch Dimethoxyäthan.

3.4.2.4. Sauerstoffaufnahme der Mikrosomen in Gegenwart von OH°-Quenchern

Eine andere Möglichkeit zur Klärung der Frage, ob die verwendeten OH°-Quencher die P-450-abhängige mikrosomale Hydroxylierung inhibieren, weil sie selbst als hydroxylierbare Substrate dienen, ist die Messung der Sauerstoffaufnahme durch die Mikrosomen. Bekanntlich verbrauchen Mikrosomen in Anwesenheit von NADPH nach Zugabe von hydroxylierbaren Substra-

ten vermehrt Sauerstoff. Es sind aber auch Substanzen bekannt (sogenannte Entkoppler), die die Sauerstoffaufnahme stimulieren, ohne hydroxyliert zu werden (132).

Daher wurde die Rate der Sauerstoffaufnahme durch Mikrosomen in Gegenwart eines NADPH-regenerierenden Systems gemessen und auf eine mögliche Stimulierung durch einige OH·-Quencher untersucht (Tab. 17). Es ist ersichtlich, daß in Gegenwart des Substrats Aminopyrin vermehrt Sauerstoff aufgenommen wird. Auch der OH·-Quencher Dimethoxyäthan stimuliert, wenn auch in geringerem Maße, die Sauerstoffaufnahme der Mikrosomen, während in Gegenwart von t-Butanol der Sauerstoffverbrauch nicht erhöht ist. Werden Aminopyrin und Dimethoxyäthan bzw. Aminopyrin und t-Butanol gleichzeitig angeboten, so kommt es in beiden Fällen zu einer Stimulierung der Sauerstoffaufnahme.

Tab. 17: Sauerstoffaufnahme der Mikrosomen in Gegenwart von Aminopyrin und einigen Quenchern von OH·

Basalrate (nMole O_2/min u.mg)	Rate nach Substratzugabe (nMole O_2/min u.mg)	Stimulation (nMole O_2/min u.mg)
10	20 mM Aminopyrin: 14	4
8	55 mM Dimethoxyäthan: 10	2
9	67.5mM t-Butanol: 8	0
11	20 mM Aminopyrin 55 mM Dimethoxyäthan: 14	3
7	20 mM Aminopyrin 67.5 mM t-Butanol: 11	4

3.4.2.5. Bestimmung der Formaldehydbildung

Demethylierungsreaktionen können durch Messung der Formaldehydbildung nach Nash (107) verfolgt werden. Falls die OH°-Quencher Methional, Dimethoxyäthan und t-Butanol Substrate der Cytochrom P-450-abhängigen Hydroxylierungsaktivität wären, so sollte sich dies durch die Bildung von Formaldehyd zeigen (im Falle von Methional wäre auch eine Oxidation des Schwefels ohne Formaldehydbildung denkbar).
Deshalb wurde die Formaldehydbildung durch Mikrosomen in Abwesenheit eines exogenen Substrats und nach Zugabe der demethylierbaren Substrate p-Nitroanisol und Aminopyrin sowie der OH°-Quencher Methional, t-Butanol und Dimethoxyäthan bestimmt (Tab. 18). Alle Verbindungen mit Ausnahme von t-Butanol führten zur Stimulierung der Formaldehydbildung.

Tab. 18: Formaldehydbildung in Abwesenheit und Gegenwart von Substraten oder Quenchern von OH°

Reaktionsansatz	nMole Formaldehyd gebildet/10 min u. mg
kein exogenes Substrat	1
20 mM Aminopyrin	40
55 mM Dimethoxyäthan	7.5
1 mM p-Nitroanisol	7
0.5mM Methional	4
67.5 mM t-Butanol	1

Da Dimethoxyäthan sowohl die Sauerstoffaufnahme als auch die Formaldehydbildung stimuliert, und zumindestens bei hohen Konzentrationen kompetetiv hemmt, scheint die Inhibierung

der mikrosomalen Hydroxylierung von p-Nitroanisol durch Dimethoxyäthan darauf zu beruhen, daß diese Verbindung als Substrat verstoffwechselt wird. t-Butanol stimuliert weder die Sauerstoffaufnahme noch die Formaldehydbildung, wird also nicht als Substrat in der mikrosomalen Hydroxylierungsreaktion verstoffwechselt. Daher ist es durchaus möglich, daß t-Butanol die Reaktion inhibiert, weil es mit $OH^{\cdot}$ reagiert, woraus auf eine Beteiligung dieser Sauerstoffspezies am Mechanismus der Cytochrom-P-450-abhängigen Hydroxylierung geschlossen werden könnte.

3.5. Zur Beteiligung von O_2^* am Mechanismus der Cytochrom P-450-abhängigen mikrosomalen Hydroxylierung

Es ist wiederholt vorgeschlagen worden, daß die reaktive Form von O_2 in biologischen Reaktionen der angeregte Singlet-Zustand sei. Dieser Sauerstoff besitzt eine Reaktivität, die sehr verschieden von der des Triplet-Grundzustandes ist. Trotz der großen Reaktivität von Singlet Sauerstoff ist es unwahrscheinlich, daß diese Sauerstoffspezies eine bedeutende Rolle in Oxygenasereaktionen spielt, da die meisten Reaktionsprodukte organischer Verbindungen mit Singlet Sauerstoff Peroxide sind, während typische Substrate von Monxygenasen nicht zu Peroxiden verstoffwechselt werden. Außerdem reagiert Singlet Sauerstoff nicht mit Alkanen oder nichtaktivierten aromatischen Verbindungen. Da jedoch Singlet Sauerstoff in Mikrosomen gebildet wird - als Vorläufer könnten Lipidperoxide oder O_2^- dienen - sollte an dieser Stelle untersucht werden, ob

Quencher von O_2^* die NADPH-abhängige mikrosomale Hydroxylierung inhibieren.

Für diese Inhibierungsstudien wurden die lipohilen O_2^* -Quencher Diphenylfuran (46) und Diphenylisobenzofuran(47) sowie die hydrophilen O_2^* -Quencher Azid (48) und DABCO (50) in Konzentration bis zu 5 mM verwendet, ohne daß eine Inhibierung der Dealkylierung von p-Nitroanisol zu p-Nitrophenol festgestellt wurde. Da die verwendeten Quencher sehr leicht mit Singlet Sauerstoff reagieren, kann geschlossen werden, daß O_2^* nicht am Mechanismus der Dealkylierung zumindestens dieses Substrates beteiligt ist.

3.6. Zur Beteiligung aktivierter Sauerstoffspezies am Mechanismus der Cytochrom P-448-abhängigen mikrosomalen Hydroxylierung

Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe werden erst nach Aktivierung in der Zelle cancerogen. Diese Aktivierung erfolgt hauptsächlich in Lebermikrosomen mit Cytochrom P-448 als terminaler Oxidase. Am besten untersucht ist die Aktivierung von Benzpyren, von dem nach Metabolisierung durch Mikrosomen mit Hilfe von Hochdruckflüssigkeitschromatographie 10 Derivate aufgetrennt werden können (133) und deren Mutagenität bestimmt worden ist (134). Mit der methodisch weniger aufwendigen Dünnschichtchromatographie können etwa sechs Derivate charakterisiert werden (111).

Über den Mechanismus der Aktivierung ist bisher wenig bekannt. Wahrscheinlich ist die primäre Reaktion am polycyclischen Aromaten die Bildung eines Epoxids. Es ist jedoch unklar, auf

welche Weise diese reaktive Zwischenstufe gebildet wird. Man weiß auch nicht, ob alle Derivate über demselben Mechanismus entstehen. Ebenfalls unbekannt ist, ob die vielen Derivate, die nach Aktivierung durch Mikrosomen gefunden werden, alle in einer Enzym-abhängigen Reaktion gebildet werden, oder ob sich nicht einige davon durch spontane, nicht Enzym-katalysierte Reaktionen aus enzymatisch aktivierten Vorläufern bilden.

Deshalb erschien es nötig, ähnlich wie bei den Cytochrom-P-450-abhängigen Reaktionen die Beteiligung aktiver Sauerstoffspezies an der Cytochrom P-448-abhängigen Aktivierung von Benzpyren zu untersuchen und danach durch quantitative Bestimmung der relativen Mengen der gebildeten Derivate festzustellen, ob alle Derivate enzymatisch und über denselben Mechanismus gebildet wurden.

Eine genauere Untersuchunge des Stoffwechsels von Benzpyren ist methodisch recht schwierig. Die Aussagekraft der Ergebnisse hängt stark von der Analytik ab. Benzpyren ist lichtempfindlich, weswegen alle Operationen im Dunkeln oder unter Rotlicht ausgeführt werden müssen.

Die Trennung des Benzpyrens von seinen Stoffwechselprodukten geschieht auf Grund der verschiedenen Löslichkeiten in polaren bzw. unpolaren Lösungsmitteln. Der Stoffwechsel von Benzpyren wird entweder fluorimetrisch (109) oder mit Hilfe von radioaktiv markiertem Benzpyren (110) bestimmt. Beim fluorimetrischen Test wird hauptsächlich 3-Hydroxybenzpyren neben geringen Mengen von 9-Hydroxybenzpyren erfaßt (111), die zusammen etwa 40% der Benzpyrenmetaboliten ausmachen. Im

radioaktiven Test dagegen werden alle polaren Benzpyrenderivate erfaßt, also auch diejenigen, die hydratysiert, mit Schwefelsäure oder Glutathion gekoppelt oder an andere niedermolekulare Stoffe gebunden sind.
Die weitere Auftrennung der Metaboliten erfolgt chromatographisch. Die beste Methode ist dabei die Hochdruckflüssigkeitschromatographie, die am Nathional Cancer Institute (NCI) in Bethesda, Maryland, USA von Gelboin und Mitarbeitern angewendet wird. Mit Hilfe von Referenzsubstanzen, die ebenfalls am oder im Auftrag vom NCI synthetisiert werden, ist es möglich, bis zu 10 Benzpyrenmetabolite zu identifizieren und quantitativ zu bestimmen. Leider ist diese Methode nicht überall anwendbar, da die Referenzsubstanzen nur denjenigen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt werden, die mit dem NCI zusammenarbeiten. Methodisch einfacher ist die Auftrennung der Metaboliten durch Dünnschichtchromatographie. Durch Vergleich der R_f-Werte und der Farbe der unter UV-Licht fluoreszierenden Flecken auf dem Chromatogramm mit Daten aus der Literatur können sechs Metabolite identifiziert werden.

3.6.1. Inhibierung der Cytochrom P-448-abhängigen mikrosomalen Hydroxylierung von Benzpyren durch Tyr_2-Cu^{2+} und Cu^{2+}-Komplexe von Aspirinderivaten

Eingehende Untersuchungen der Cytochrom P-450-abhängigen mikrosomalen Hydroxylierung mit Hilfe des Superoxid Dismutase-aktiven Tyr_2-Cu^{2+} ließen den Schluß zu (vgl. 3.3.), daß O_2^- eine wichtige Zwischenstufe der Reaktion darstellt. Abb. 28 und 29 zeigen, daß auch die Cytochrom P-448-abhängige Metaboli-

sierung von Benzpyren durch Tyr_2-Cu^{2+} gehemmt wird. Interessanterweise inhibiert der Kupferkomplex die Bildung von 3-Hydroxybenzpyren (und 9-Hydroxybenzpyren), die im fluorimetrischen Test gemessen wird (Abb. 28) mehr als den Gesamtmetabolismus von Benzpyren, wie er im radioaktiven Test gemessen wird (Abb. 29). 50% Inhibition ist im ersten Fall bei etwa 12 µM Tyr_2-Cu^{2+} zu finden, im zweiten Fall dagegen erst bei etwa 25 µM Tyr_2-Cu^{2+}. Auf Grund des Fluoreszenzemissionsspektrums und UV-Absorbtionsspektrums des Metaboliten, der im fluorimetrischen Test gemessen wurde, wurde der Metabolit als 3-Hydroxybenzpyren identifiziert.

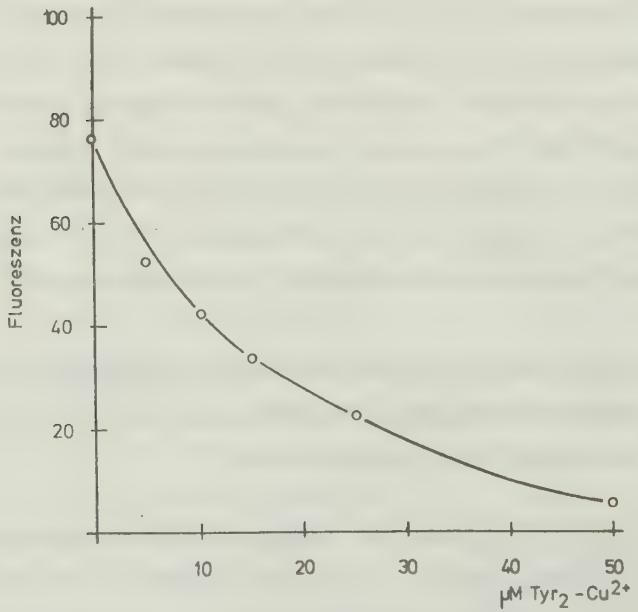


Abb. 28: Inhibierung der Bildung von 3-Hydroxybenzpyren durch Tyr_2-Cu^{2+}.

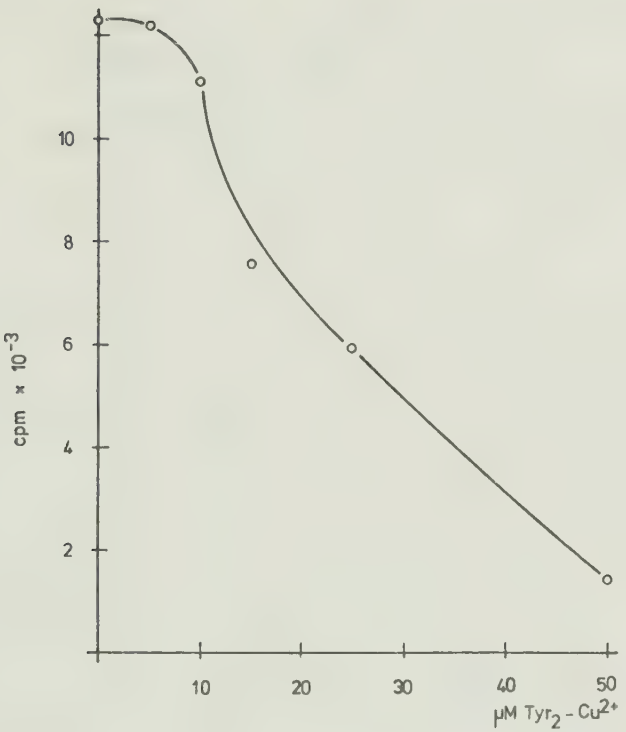


Abb. 29: Inhibierung des Gesamtstoffwechsels von Benzpyren durch Tyr_2-Cu^{2+}. Die ungehemmte Aktivität entspricht 1.o4 nMolen Benzpyren verstoffwechselt pro min und mg Protein.

Diese differenzielle Inhibierung des Benzpyrenstoffwechsels durch Tyr_2-Cu^{2+} wurde durch chromatographische Untersuchungen bestätigt. Dazu wurden die radioaktiven Benzpyrenmetaboliten auf einer Kieselgelplatte aufgetrennt und mit Hilfe der R_f-Werte und Fluoreszenzfarben identifiziert. Abb. 30 zeigt die

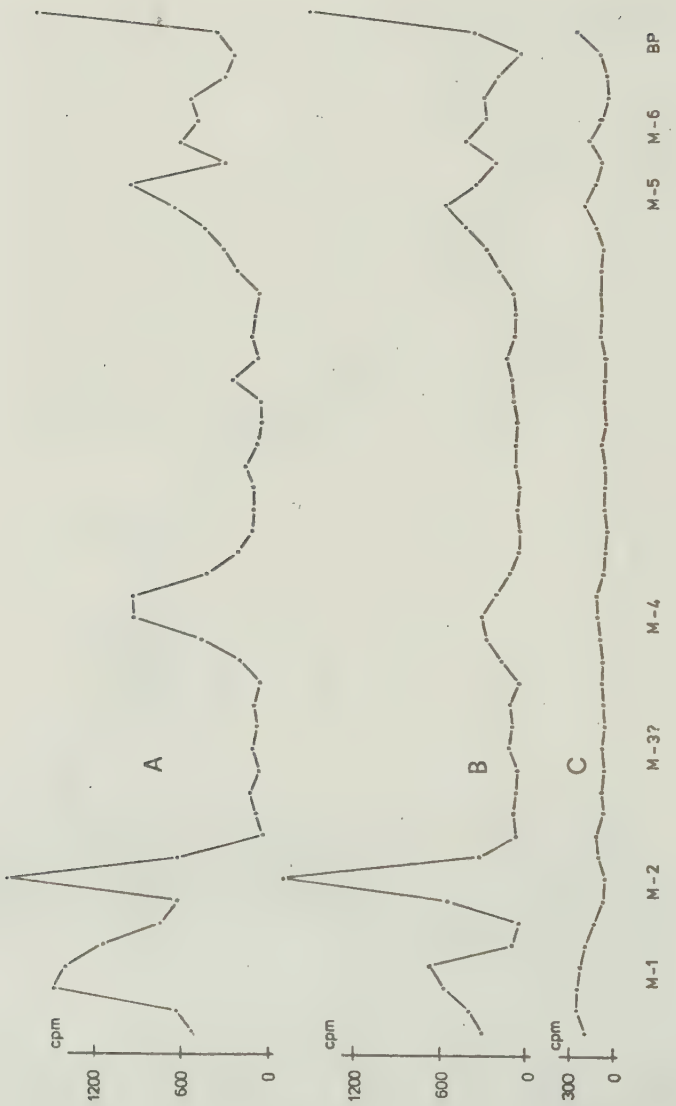
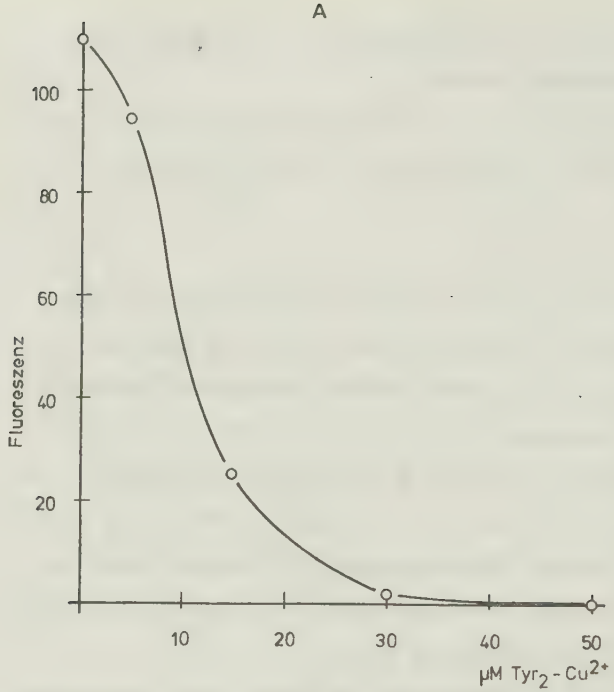


Abb. 3o: Auftrennung der Benzpyrenmetabolite im Dünnschicht-chromatogramm. A. Kontrollversuch B. Inkubation in

Gegenwart von 5o µM Tyr_2-Cu^{2+} C. Inkubation mit denaturiertem Protein.
Zur Identifizierung der Metabolite siehe Ref. (111).
1.52 x $1o^3$ cpm entsprechen 4o pMolen Benzpyren.

quantitative Auswertung eines solchen Chromatogramms. Dazu wurde das Kieselgel in zwei Millimeter breiten Streifen von der Platte gekratzt, in Szintillationsflüssigkeit überführt und ausgezählt. Vergleich von Kurve A (in Abwesenheit von Tyr_2-Cu^{2+} inkubiert) mit Kurve B (Inkubation in Gegenwart von 50 µM Tyr_2-Cu^{2+}) macht deutlich, daß das Auftreten von 3-Hydroxybenzpyren in weit größerem Ausmaß als das der anderen Metaboliten gehemmtist. Ähnliche Ergebnisse wurden nach Autoradiographie des Chromatogramms erhalten.
In Abb. 31 ist die Inhibition des Cytochrom P-448 abhängigen Stoffwechsel von Benzpyren derjenigen des Cytochrom P-450 abhängigen Stoffwechsels von 7-Äthoxycoumarin gegenübergestellt. Bei diesen beiden Untersuchungen wurden gleiche Mengen mikrosomalen Proteins verwendet (der Gehalt an Cytochrom P-448 ist nach Induktion mit Methylcholanthren geringer als der Gehalt an Cytochrom P-450 nach Induktion mit Phenobarbital; in dieser Untersuchung 0.6 nMole Cytochrom P-448/mg Protein gegenüber 1.4 nMolen Cytochrom P-450/mg Protein). In Abb. 32 wurde mit gleichen Mengen Cytochrom inkubiert. Es ist ersichtlich, daß in beiden Fällen die Reaktion an Cytochrom P-448 durch niedrigere Mengen von Tyr_2-Cu^{2+} gehemmt wird.

A


100
80
60
40
20
Fluoreszenz
10
20
30
40
50
µM Tyr2 - Cu2+

B

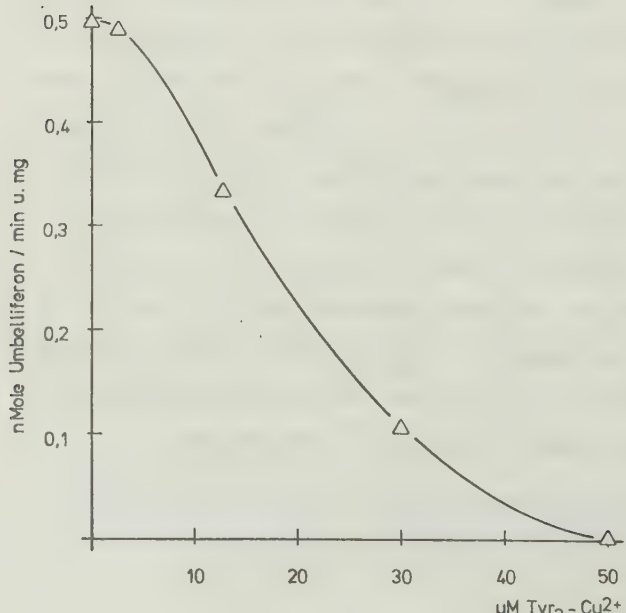

0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
nMole Umbelliferon / min u. mg
10
20
30
40
50
µM Tyr2 - Cu2+

Abb. 31: Vergleich der Cytochrom P-448-abhängigen mit der Cytochrom P-450-abhängigen mikrosomalen Hydroxylierung: Inhibierung durch Tyr_2-Cu^{2+} auf der Basis gleicher Mengen Proteins. A. Cytochrom P-448-abhängige Bildung von 3-Hydroxybenzpyren B. Cytochrom P-450-abhängige Bildung von Umbelliferon.

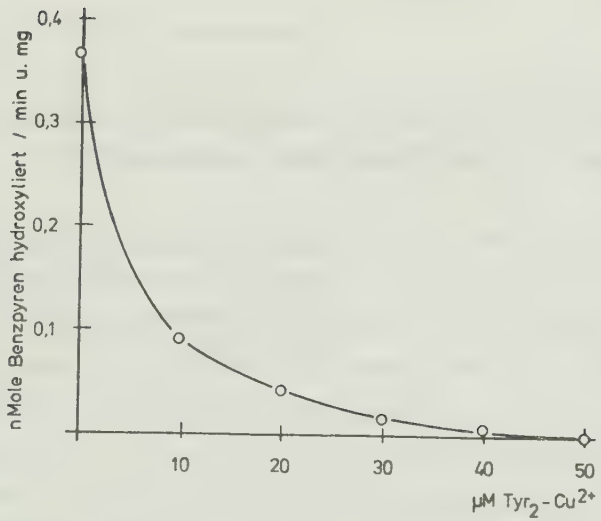


Abb. 32: Inhibierung der Cytochrom P-448-abhängigen mikrosomalen Hydroxylierung durch Tyr_2-Cu^{2+} auf der Basis gleicher Mengen Cytochroms wie sie in Abb. 31 B verwendet wurden.

Der mikrosomale Stoffwechsel von Benzpyren führt zur Bildung von Radikalderivaten des Benzpyrens (114, 135). Abb. 33 zeigt das Elektronenspinresonanzspektrum des 6-Phenoxybenzpyrenradikals in Benzol, das nach Inkubation von Benzpyren mit Mikrosomen erhalten wurde. In Gegenwart von 50 µM Tyr_2-Cu^{2+} ist die Bildung des Radikals fast vollständig inhibiert.

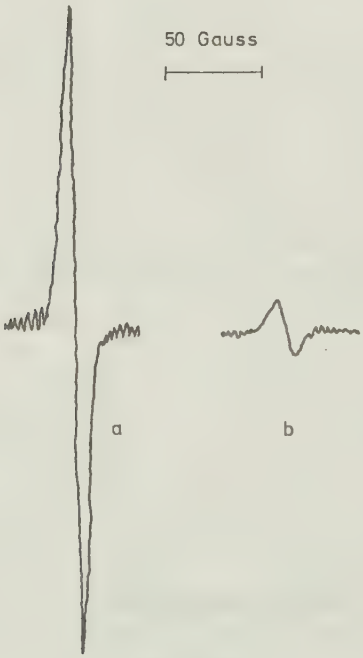


Abb. 33:
Elektronenspinresonanz des 6-phenoxybenzpyrenradikals.
a. Kontrolle b. Nach Inkubation in Gegenwart von 5o µM Tyr_2-Cu^{2+}.
sweep range 3365 ± 1oo Gauss, gain $1o^4$, modulation amplitude o.5, attenuation power 2.1 mW, time constant 1 sec.

Wurde der Kupferkomplex erst nach Beendigung der enzymatischen Reaktion zugegeben, so konnte keine Verringerung des Elektronenspinresonanzsignals festgestellt werden. Daraus muß geschlossen werden, daß Tyr_2-Cu^{2+} die Bildung des 6-Phenoxyradikals verhindert und nicht etwa dessen Zerfall beschleunigt.

Tab. 19 zeigt[1], daß auch Cu^{2+}-Komplexe von Aspirinderivaten die Hydroxylierung von Benzpyren inhibieren.

Tab. 19: Inhibierung des Cytochrom P-448-abhängigen Gesamtstoffwechsels von Benzpyren durch Cu^{2+}-Komplexe von Aspirinderivaten. 100% Aktivität entsprechen 0.5nMolen Benzpyren verstoffwechselt/min und mg Protein

Cu^{2+}-Chelat	%Aktivität
keiner	100
30 µM $(Acetylsalicylat)_2$-Cu^{2+}	17
30 µM $(Diisopropylsalicylat)_2$-Cu^{2+}	66
30 µM $(Salicylat)_2$-Cu^{2+}	74
30 µM $(p\text{-}Aminosalicylat)_2$-$Cu^{2+}$	75

3.6.2. Zur Beteilung von OH· am Mechanismus der Cytochrom-P-448-abhängigen mikrosomalen Hydroxylierung

Obwohl schon die Untersuchungen an Cytochrom P-450 (vgl.3.4.) keine eindeutige Aussage über die Beteiligung von OH· am Hydroxylierungsmechanismus zuließen, sollte mit Hilfe von OH·-Quenchern eine derartige Beteiligung an der Cytochrom P-448-abhängigen Hydroxylierung untersucht werden. Dabei wurde gefunden (Tab. 20), daß 67.5 mM Dimethoxyäthan die Reaktion überhaupt nicht beeinflußt, während in Gegenwart von 67.5 mM t-Butanol der Metabolismus von Benzpyren sogar noch leicht stimuliert ist. Diese beiden Substanzen inhibieren die Cytochrom P-450-abhängige Reaktion deutlich (vgl. Abb. 21 und 22).

---

[1]Das Ergebnis wird in Ref. (122) veröffentlicht

Tab. 20: Gesamtstoffwechsel von Benzpyren in Gegenwart der OH°-Quencher Dimethoxyäthan und t-Butanol

	nMole Benzpyren verstoffwechselt/10 min u. mg
Kontrolle	8.1
+ 55 mM Dimethoxyäthan	8.2
+ 67.5 mM t-Butanol	11.7

3.6.3. Zur Beteiligung von O_2^* am Mechanismus der Cytochrom P-448-abhängigen mikrosomalen Hydroxylierung

Der Cytochrom P-448-abhängige Metabolismus von Benzpyren wurde auch auf eine Beteiligung von O_2^* am Reaktionsmechanismus, wie unter 3.5. für Cytochrom P-450 beschrieben, untersucht. Weder der lipophile O_2^*-Quencher Diphenylfuran noch der hydrophile O_2^--Quencher DABCO führten zu einer Inhibierung des Stoffwechsel von Benzpyren.

Zusammenfassend kann auf Grund dieser Untersuchungen festgestellt werden, daß O_2^- auch am Mechanismus der Cytochrom P-448-abhängigen Hydroxylierung beteiligt ist. Interessanterweise inhibiert das Superoxid Dismutase-aktive Tyr_2-Cu^{2+} die Bildung der verschiedenen Benzpyrenmetabolite jedoch nicht in gleichem Ausmaß. Dies läßt vermuten, daß einige Metabolite ohne die Beteiligung von Superoxid Radikalen gebildet werden. Auf eine Beteiligung von OH° am Reaktionsmechanismus an Cytochrom P-448 kann, im Gegensatz zu Cytochrom P-450, nicht geschlossen werden. Die Anwesenheit von OH°-Fängern führt eher

zu einer Stimulierung der Hydroxylierungsreaktion, was wahrscheinlich auf eine Schutzfunktion an der Mikrosomenmembran durch diese Verbindungen zurückzuführen ist.

4. Diskussion

In den letzten Jahren sind zahlreiche Fragen zum Mechanismus der mikrosomischen Monoxygenasereaktion der Rattenleber im Detail beantwortet worden, während andere noch nicht geklärt sind. Viele Anregungen kamen dabei von Untersuchungen, die an Monoxygenasen anderen Ursprungs durchgeführt wurden. Hier sind vor allem Mitochondrien aus der Nebennierenrinde und das Kampher-oxidierende System aus Pseudomonas putida zu erwähnen, deren Komponenten leichter isoliert und gereinigt werden können als die der Rattenlebermikrosomen.
Die ersten Schritte der mikrosomalen Monoxygenasereaktion sind genau untersucht worden und können als geklärt angesehen werden: Das Substrat bindet sich an die oxidierte Form von Cytochrom P-450, wobei dieses von der low spin- zur high spin-Form übergeht. Gleichzeitig mit der Bindung des Substrats ist in vielen Fällen die Bildung eines sogenannten Substratspektrums durch Verschiebung des Absorptionsmaximums in der Soretgegend zu beobachten. Die Bildung dieses Komplexes stellt höchstwahrscheinlich eine stöchiometrische Bindung von einem Substratmolekül an oder nahe des Eisenatoms des Cytochroms dar und führt zu einem Ansteigen dessen Redoxpotentials von - 400 mV zu -170 mV. Nach der Bildung des Enzym-Substrat-

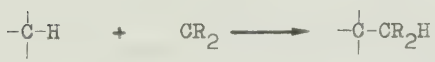
Komplexes erfolgt eine schnelle Reduktion durch ein Elektron, das von NADPH-Cytochrom P-450 Reduktase geliefert wird. In Gegenwart von Substrat ist die Reduktionsrate bemerkenswert höher als in dessen Abwesenheit, wodurch eine Regulation des Sauerstoff- und Elektronenverbrauchs durch das Substratangebot ermöglicht wird. Der nächste Schritt der Reaktionsfolge besteht aus der Bindung eines Sauerstoffmoleküls an das reduzierte Cytochrom unter Bildung des ternären Substrat-Sauerstoff-Cytochrom-Komplexes. Diese Sauerstoffanlagerung ist analog der Oxigenierung von Hämoglobin oder Myoglobin. Kohlenmonoxid kann den Sauerstoff verdrängen und bildet den charakteristischen Komplex, der bei 450 nm ein Absorptionsmaximum besitzt. Der ternäre Komplex wird anschließend durch ein zweites Elektron reduziert, das von NADPH-Cytochrom P-450 Reduktase, vielleicht aber auch von NADH-Cytochrom b_5 Reduktase via Cytochrom b_5 geliefert wird. Diese zweite Reduktion führt zur Bildung des "aktiven Sauerstoff-Komplexes". Die Formulierung aller Reaktionsschritte, die von diesem Komplex bis zur Bildung des oxygenierten Substrats und zur Regenerierung von Cytochrom P-450 in der Fe^{3+}-Form führen, müssen bisher als mehr oder weniger spekulativ angesehen werden.

4.1. Die Natur des "aktiven Sauerstoffs"

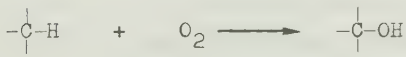
Die Natur des "aktiven Sauerstoffs" im ternären Komplex ist eines der wichtigsten, aber auch am schwierigsten zu lösenden Probleme der Monoxygenasereaktion. Es ist sehr wahrscheinlich,

daß diese Reaktion letztlich nach einem Sauerstoffatom-Transfer oder Oxenoid-Mechanismus abläuft. 1964 beschrieb Hamilton (98) die bemerkenswerte Ähnlichkeit zwischen Monoxygenasereaktion und Reaktionen, die von Carbenen und Nitrenen eingegangen werden. Carbene und Nitrene sind äußerst reaktive Zwischenstufen in vielen Reaktionen der organischen Chemie. Sie besitzen nur sechs Elektronen in der äußeren Schale.
Ein Oxen ist eine Sauerstoffverbindung, in der der Sauerstoff ebenfalls nur sechs Elektronen in der äußeren Hülle enthält. Die Ähnlichkeit zwischen Carbenreaktionen (Nitrene reagieren analog) und Monoxygenasereaktionen ist an den folgenden Beispielen zu erkennen:

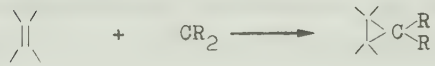
1. Carbene inserieren in nichtaktivierte Kohlenwasserstoffbindungen unter Erhalt der Konfiguration:



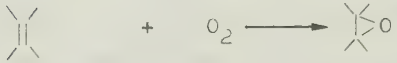
Monoxygenasen oxidieren nichtaktivierte Kohlenwasserstoffe zu Alkoholen, wobei in den Fällen, die untersucht worden sind, ebenfalls die Konfiguration erhalten bleibt:



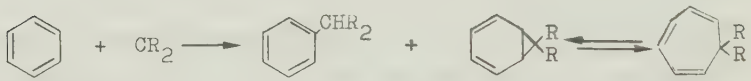
2. Carbene addieren an Alkene unter Bildung von Cyclopropanverbindungen:



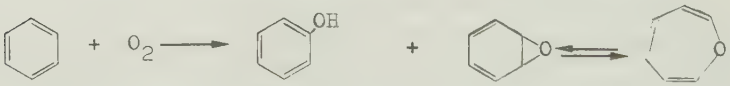
Analog dazu katalysieren Monoxygenasen die Epoxydierung von Alkenen:



3. Carbene reagieren mit aromatischen Verbindungen zu Alkylbenzolen und Norcaradienen, die mit Cycloheptatrienen im Gleichgewicht stehen:

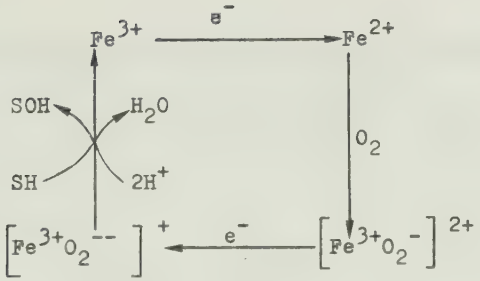


Analog dazu katalysieren Monoxygenasen die Bildung von Phenolen und Arenoxiden, die im Gleichgewicht mit Oxepinen stehen:

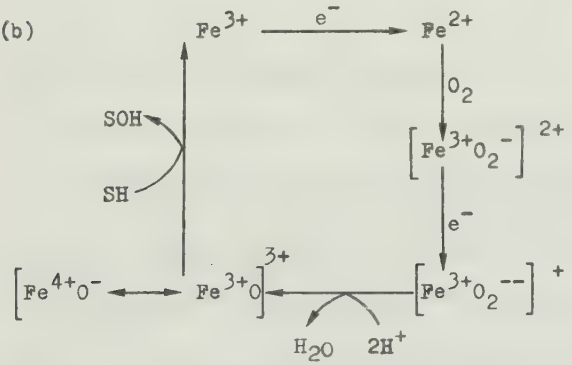


Da aus energetischen Gründen das Auftreten eines freien Sauerstoffatoms in biochemischen Systemen unwahrscheinlich ist, schlug Hamilton vor, daß die eigentliche oxidierende Verbindung der Monoxygenasereaktion eine Verbindung ist, die ein gebundenes Sauerstoffatom auf das Substrat überträgt, und nannte diesen Mechanismus den Oxenoid-Mechanismus .
Die Oxenoidspezies dürfte dabei entweder die Struktur eines polarisierten Fe^{3+}-Peroxids (a) oder eines Ferrylions (b) besitzen, je nachdem ob Wasser vor oder nach der Monoxygenierungsreaktion abgespalten wird:

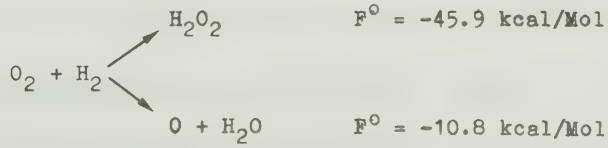
(a)



(b)

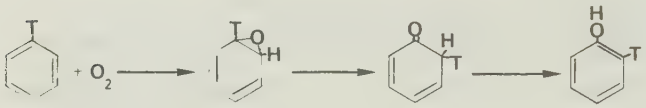


Während der Reduktion von molekularem Sauerstoff durch zwei Elektronen ist die Bildung eines Sauerstoffatoms und Wassers anstelle von Wasserstoffperoxid energetisch möglich (136):



Der wichtigste experimentelle Hinweis für die Richtigkeit des Oxenoid-Modells sind die eleganten Arbeiten, die am National Institute of Health durchgeführt und unter dem Namen "NIH-shift" bekannt geworden sind (99). Man fand dort,

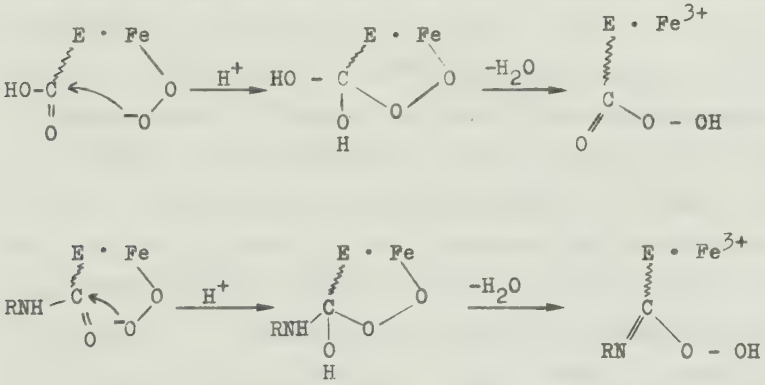
daß während enzymatischer Hydroxylierung am Aromaten eine Wanderung des Wasserstoffs zu beobachten ist, wobei die Initialreaktion die Bildung eines Arenoxids ist.



Modellreaktionen mit Sn^{2+}, Phosphat und Sauerstoff in wässrigen Lösungen sowie Oxidationen durch Trifluorperessigsäure, die analog den Monoxygenasereaktionen verlaufen, führten Ullrich und Staudinger (90, 130) ebenfalls zu dem Schluß, daß diese Reaktionen nach einem Oxenoid-Mechanismus ablaufen. Die starke Polarisation der O-O-Bindung im Peroxidkomplex scheint auszureichen, um im Übergangszustand ein Oxenoid zu bilden.
Schließlich ist es möglich, in Rattenlebermikrosomen in Abwesenheit von O_2 und NADPH mit Hilfe von Sauerstoffatom-Donatoren wie Jodosobenzol oder 3-Chloroperbenzoesäure die Monoxygenasereaktion ablaufen zu lassen (101).

Weder die genaue Struktur des Oxenoid-Reagenzes noch die Art seiner Bildung ist geklärt. Es ist jedoch am wahrscheinlichsten (91), daß es von einem Enzym-Fe^{3+}-Peroxidkomplex dargestellt wird. Das Peroxid soll dabei nicht direkt an das Eisenatom gebunden sein, da Fe^{3+}-Peroxide nur träge mit Alkanen oder Aromaten reagieren, sondern durch nucleophilen Angriff einer Sauerstoffspezies an einer Carboxyl- oder

Amidgruppe an Cytochrom P-450 unter Bildung einer Persäure oder eines Peramides gebildet werden:



Der nucleophile Angriff soll dabei durch einen $Fe^{2+}O_2^-$ - oder durch einen $Fe^{3+}O_2^{2-}$-Komplex erfolgen, der von Hamilton als supernucleophil bezeichnet wird.
Persäuren und Peramide sind sehr reaktiv, reagieren wie Oxenoide und sind in der Lage, nahezu alle Reaktionen einzugehen, die an Cytochrom P-450 ablaufen.

4.2. Hydroxylierung im rekonstituierten mikrosomalen System

Die von Coon und Mitarbeitern durchgeführte Isolierung, Reinigung und Rekonstituierung des mikrosomalen P-450-Systems stellen einen wichtigen Beitrag zum Verständnis dieses Systems dar. Die Tatsache, daß auf der einen Seite Superoxid Dismutase die Hydroxylierung im rekonstituierten System inhibiert und NADPH-Cytochrom P-450 Reduktase durch einen Generator von O_2^- ersetzt werden kann, auf der anderen Seite Superoxid Dismutase während der Reaktion in intakten Mikrosomen unwirksam

ist, kann jedoch auf verschiedene Weise interpretiert werden. Eine Möglichkeit ist, daß durch die Isolierung und Reinigung die terminale Oxidase Cytochrom P-450 in ihrer Reaktionsweise derart verändert worden ist, daß sie im rekonstituierten System mit O_2^- reagiert, während in der Membran in situ O_2^- keine Rolle spielt. Andererseits ist es denkbar, daß O_2^- auch in der Membran am Reaktionsmechanismus beteiligt ist, Superoxid Dismutase aber die Reaktion deswegen nicht inhibiert, weil sie als großes und polares Enzymmolekül das aktive Zentrum von Cytochrom P-450, das in der Lipidphase der Membran eingebettet ist, nicht erreichen kann und somit keine Inhibierung bewirkt.

4.3. Zur Beteiligung von O_2^- am Hydroxylierungsmechanismus in intakten Phenobarbital-induzierten Mikrosomen

Nachdem sich gezeigt hatte, daß bestimmte kleine Kupferkomplexe eine hohe und spezifische Superoxid Dismutaseaktivität aufweisen, erschien es wichtig, sie als spezifische Inhibitoren der Hydroxylierung in intakten Mikrosomen zu testen. Der Grund für die Wahl der Kupferkomplexe beruhte auf der Möglichkeit, daß, falls O_2^- am Reaktionsmechanismus beteiligt ist, physikalische Barrieren das Radikal im aktiven Zentrum in der Membran konzentrieren sollten, um eine effiziente Hydroxylierung zu ermöglichen. Deswegen wäre zu erwarten, daß nur kleine und hydrophobe Komplexe mit Superoxid Dismutaseaktivität eine spezifische Inhibierung bewirken. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der Versuch gemacht, mit Hilfe

solcher Komplexe eine Beteiligung von O_2^--Radikalen am Hydroxylierungsmechanismus in intakten Rattenlebermikrosomen nachzuweisen.

Zunächst wurde dazu mittels zweier unabhängiger Methoden das Auftreten von O_2^- in Mikrosomen nach Zugabe des physiologischen Elektronendonors NADPH gemessen. Wie schon in der Einleitung erwähnt, ist es schwierig, O_2^- quantitativ zu bestimmen, und es ist nicht möglich, die Ergebnisse, die mit verschiedenen Methoden erhalten werden, direkt zu vergleichen. Sowohl mit modifiziertem Cytochrom c als auch mit der Adrenalinmethode konnte das Auftreten von O_2^- gemessen werden. Eine Erklärung dafür, daß sich die gemessene Mengen um mehr als eine Zehnerpotenz unterscheiden, ist sowohl darin zu suchen, daß sich die Akzeptoren für O_2^- in ihren Affinitäten zu diesem Radikal unterscheiden als auch vor allem darin, daß das große Proteinmolekül des modifizierten Cytochroms nur die Radikale mißt, die die Mikrosomenmembran verlassen können. Da auch in der mikrosomalen Fraktion der Rattenleber Superoxid Dismutase zu finden ist, ist nur mit dem freien Auftreten geringer Mengen von O_2^- zu rechnen. Adrenalin als kleines Molekül dürfte dagegen in der Lage sein, auch diejenigen O_2^--Radikale wegzufangen, die innerhalb der Membran, etwa an Cytochrom P-450, produziert werden oder nicht frei in Lösung sind.

Viele Hämproteine sind autoxidabel und bilden O_2^-. Durch Photodissoziation des reduzierten P-450·CO-Komplexes wurde in Experimenten, die hier nicht dargestellt wurden, versucht, die Produktion von O_2^- an Cytochrom P-450 in der Membran zu

messen. Technische Schwierigkeiten machten eine eindeutige Schlußfolgerung jedoch unmöglich.

Eine Anzahl von Verbindungen, die Superoxid Dismutaseaktivität aufweisen, wurde auf eine Hemmwirkung während der mikrosomalen Hydroxylierung untersucht. Eine solche Hemmwirkung deutet auf eine Beteiligung von O_2^- an der Hydroxylierung. Dabei bestätigte sich, daß das Enzym Superoxid Dismutase keine Wirkung zeigte, während niedermolekulare Verbindungen mit Superoxid Dismutaseaktivität die O-Dealkylierung von p-Nitroanisol oder 7-Äthoxycoumarin inhibierten. Der Komplex Tyr_2Cu^{2+} erwies sich dabei als besonders effektiver Inhibitor. Die Oxidation der verwendeten Substrate p-Nitroanisol, Aminopyrin, 7-Äthoxycoumarin und Benzo[α]pyren wurde von etwa 10 bis 25 µM Tyr_2-Cu^{2+} zu 50% inhibiert.

In einer Reihe von Versuchen wurde daraufhin versucht, die ursprüngliche Vermutung zu erhärten, daß der Kupferkomplex aufgrund seiner Dismutaseaktivität wirksam ist.

Der Komplex inhibierte weder das NADPH-regenerierende System noch führte er zu einer Transformation von Cytochrom P-450 in seine inaktive Form P-420. Auch wurde er nicht als Substrat verstoffwechselt: Eine kinetische Untersuchung zeigte eine bezüglich des Substrats p-Nitroanisol nichtkompetetive Hemmung der Dealkylierung an. Ferner wurde in Gegenwart des Komplexes kein Substratspektrum gemessen, und der Komplex bewirkte auch keine Veränderung des typischen Substratspektrums von Aminopyrin. Schließlich wurde auch keine Stimulierung der Sauerstoffaufnahme durch die Mikrosomen in Gegenwart von Tyr_2-Cu^{2+} beobachtet, wie es bei einer Hydroxylierung des

Komplexes der Fall wäre.

Die Geschwindigkeit des Elektronenflusses von NADPH zu Cytochrom P-450 wurde durch 50 µM Tyr_2-Cu^{2+} nicht verringert: Weder die Aktivität des Enzyms NADPH-Cytochrom c Reduktase noch die Geschwindigkeit der Reduktion der mikrosomalen Pigmente Cytochrom b_5 und Cytochrom P-450 wurde wesentlich beeinflußt.

Während der mikrosomalen Hydroxylierung werden Elektronen zur Sauerstoffaktivierung und anschließenden Bildung von Wasser benötigt. Da das Kupferion in Tyr_2-Cu^{2+} redoxaktiv ist, wäre es denkbar, daß der Komplex die mikrosomale Reaktion dadurch inhibiert, daß er die zur Hydroxylierung benötigten Elektronen an Cytochrom P-450 abfängt. Experimentell wurde diese Hypothese untersucht, indem geringe Mengen NADPH (20 µM) in Abwesenheit von Sauerstoff zu einer anaeroben Suspension von Mikrosomen zugegeben wurden und das Ausmaß der Reduktion der mikrosomalen Pigmente bei 557-540 nm in Gegenwart und Abwesenheit von 50 µM Tyr_2-Cu^{2+} gemessen wurde. Würde der Kupferkomplex in Abwesenheit von Sauerstoff Elektronen aufnehmen und die Cytochrome direkt oxidieren, so sollte sich dies in einem verringerten Ausmaß der Reduktion der mikrosomalen Pigmente ausdrücken. Dies war jedoch nicht der Fall (Abb. 11 B). Wurde das gleiche Experiment jedoch in Gegenwart von Sauerstoff ausgeführt, so führte der Kupferkomplex zu einer niedrigeren steady-state-Reduktion und zu einer schnelleren Reoxidierung der Cytochrome (Abb. 11 A). Daraus kann geschlossen werden, daß die Stimulation der Oxidation durch Tyr_2-Cu^{2+} die Gegenwart von Sauerstoff voraussetzt.

Falls die Wirkung des Kupferkomplexes während der mikrosomalen Hydroxylierung auf eine Dismutation von O_2^- beruhte, so sollte die Nettoaufnahme von Sauerstoff in Gegenwart von $Tyr_2\text{-}Cu^{2+}$ verringert sein. Das Ausmaß der Inhibierung der Sauerstoffaufnahme ist jedoch schwierig vorherzusagen: Bei eng gekoppelter Substrathydroxylierung und in Abwesenheit des Kupferkomplexes wird pro Elektronenpaar ein Molekül O_2 verbraucht. Bei vollständiger Inhibierung der Substrathydroxylierung durch Dismutation von O_2^- sollte die Inhibierung der Sauerstoffaufnahme nach

$$2\ O_2 + 2\ e^- \longrightarrow 2\ O_2^- \xrightarrow[2\ H^+]{Tyr_2\text{-}Cu^{2+}} H_2O_2 + O_2$$

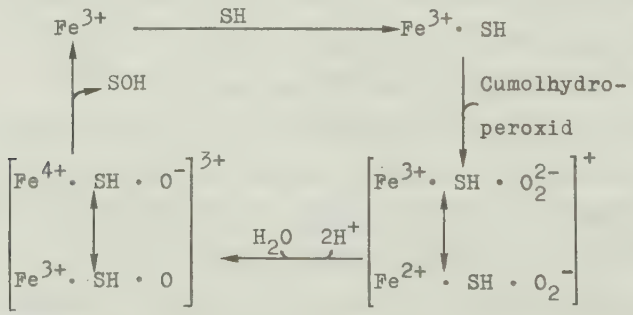
$$H_2O_2 \xrightarrow{Katalase} H_2O + 1/2\ O_2$$

75% betragen. Diese Berechnung setzt neben der Annahme einer vollständigen Kopplung voraus, daß Cytochrom P-450 der einzige Generator für O_2^- in den Mikrosomen ist. Da jedoch auch größere Mengen von O_2^- durch das Flavoprotein NADPH-Cytochrom c Reduktase produziert werden und diese durch Superoxid Dismutase in Gegenwart und Abwesenheit von Substrat in gleichem Ausmaß dismutiert werden, sollte die Inhibierung der Gesamtsauerstoffaufnahme weniger als 75% betragen. Dieser Sachverhalt soll an einem Zahlenbeispiel erläutert werden: Angenommen, das Flavoprotein produziert 6 O_2^- und Cytochrom P-450 4 O_2^-, die bei vollständiger Kopplung für die Substrathydroxylierung verbraucht werden; der Sauerstoffverbrauch beträgt also zehn Einheiten. Werden nun in Gegenwart von $Tyr_2\text{-}Cu^{2+}$ durch Dismutation 75% des Sauerstoffs, der während der ungehemmten Hydroxylierung in das Substrat eingebaut würde, dem System wieder zugeführt, so beträgt trotz vollständiger

Dismutation von O_2^- an Cytochrom P-450 der Sauerstoffverbrauch noch sieben Einheiten.
In einer Anzahl von Experimenten wurde der Sauerstoffverbrauch in Abwesenheit und Gegenwart von 50 µM Tyr_2-Cu^{2+} gemessen (vgl. Abb. 14). In allen Fällen inhibierte der Kupferkomplex. Das Ausmaß der Inhibierung variierte jedoch mit dem Alter der Mikrosomen und von Präparation zu Präparation zwischen 75 und 40%.

Die bisher diskutierten Versuche legen den Schluß nahe, daß Tyr_2-Cu^{2+} aufgrund seiner Dismutaseaktivität an Cytochrom P-450 die mikrosomale Hydroxylierung inhibiert. Um den Ort der Wirkung des Kupferkomplexes genauer zu untersuchen, wurden Versuchsbedingungen gewählt, während denen nur Cytochrom P-450 an der Hydroxylierung beteiligt ist und die übrigen Komponenten des mikrosomalen Systems vernachlässigt werden können. Auf diese Weise sollte geklärt werden, ob Tyr_2-Cu^{2+} tatsächlich an Cytochrom P-450 wirksam wird.
Neuere Arbeiten von Hrycay und Ernster hatten gezeigt, daß Cytochrom P-450 als Peroxidase fungieren und die Peroxid-abhängige Hydroxylierung in Lebermikrosomen in Abhängigkeit von NADPH und molekularem Sauerstoff katalysieren kann.
Die Zugabe oxidierender Substanzen wie Cumolhydroperoxid führt zur vorübergehenden Bildung von Komplexen, die in der Soretgegend absorbieren und als höhere Valenzzustände von Cytochrom P-450 interpretiert wurden (113), da ähnliche spektrale Veränderungen beobachtet werden, wenn die oxidierenden Substanzen mit anderen Häm-Protein-Peroxidasen wie z.B. Meerrettichperoxidase, Cytochrom c Peroxidase,

Chloroperoxidase, Katalase und Metmyoglobin reagieren. Die in diesen Fällen gebildeten Komplexe sind die entsprechenden Compound I-Verbindungen, von denen angenommen wird, daß das Häm-Eisen die Ferryl-Struktur besitzt, d.h., im quadrivalenten Zustand ein Sauerstoffatom gebunden hat. Nach Hrycay und Ernster bildet sich diese Spezies nach Zugabe von Cumolhydroperoxid direkt durch Übertragung eines Sauerstoffatoms auf die Fe^{3+}-Form von Cytochrom P-450 (vgl. Abb. 16). Wie in Tab. 11 gezeigt, werden nach Zugabe von Cumolhydroperoxid zu Mikrosomen jedoch O_2^--Radikale gemessen, deren freies Auftreten durch Tyr_2-Cu^{2+} inhibiert wird und die auch in Gegenwart eines hydroxylierbaren Substrats nicht gemessen werden können. Dies bedeutet, daß das von Hrycay aufgestellte Reaktionsschema modifiziert werden muß. O_2^- ist vermutlich an der Bildung der Ferrylverbindung nach



beteiligt.

Die kinetische Analyse der Bildung des Komplexes nach Zugabe von Cumolhydroperoxid, der in der Soret-Gegend absorbiert, zeigte, daß das Ausmaß, jedoch nicht die Geschwindigkeit der Bildung durch Tyr_2-Cu^{2+} inhibiert wird, vermutlich, weil ein notwendiger Vorläufer dieser Spezies abgefangen wird. Die

zweiphasische Bildung und die Tatsache, daß etwa die Hälfte der gebildeten Komponente langsam reagiert, ist ein indirekter Hinweis, daß es sich tatsächlich um eine Reaktion an Cytochrom P-450 handelt, denn auch die Reduktion von Cytochrom P-450 durch NADPH-Cytochrom P-450 Reduktase verläuft zweiphasig, wobei 54% des Cytochroms langsam reduziert werden.

Die Wechselwirkung membrangebundener Enzyme mit ihren Substraten oder untereinander stellt ein interessantes Problem in kinetischen Untersuchungen dar, da die üblichen Annahmen, die bezüglich der Wechselwirkung zwischen Enzym und Substrat in freier Lösung gemacht werden, nicht zutreffen. NADPH-Cytochrom P-450 Reduktase und Cytochrom P-450 sind eng mit der mikrosomalen Membran verbunden, und ihre Wechselwirkung kann durch kinetische Messungen untersucht werden. Cytochrom P-450 ist in etwa zwanzigfachem Überschuß gegenüber der Reduktase in der Membran vorhanden. Inhibitorstudien mit dem Quecksilberreagens Mersalyl (O- [(3-Hydroxymercuri-2-methoxypropyl) carbamyl] phenoxyacetat) führten Estabrook und Mitarbeiter (81) zu dem Schluß, daß ein starres Elektronentransportsystem ein einzelnes Reduktasemolekül mit einer Anzahl von Cytochromen zu einem Vielkomponentenkomplex verbindet und daß Reduktionsäquivalente nur innerhalb eines einzelnen Komplexes übertragen werden können. Ebenfalls aus Messungen mit Hilfe von Mersalyl schloß Yang (82) dagegen diese starre Anordnung aus und schlug stattdessen vor, daß laterale Mobilität von Reduktase und Cytochrom in der Membran eine Wechselwirkung zwischen den beiden Komponenten ermöglicht. In einer

neueren Arbeit postuliert Estabrook (83) schließlich aufgrund der biphasischen Reduktion von Cytochrom P-450 durch NADPH-Cytochrom P-450 Reduktase, daß das mikrosomale Enzymsystem in "clusters" in der Membran vorkommt, wobei der Großteil der Cytochrom P-450-Moleküle um ein zentrales Reduktasemolekül angeordnet ist und dadurch rasch reduziert werden kann. Die langsame Phase der Reduktion soll die Reduktion derjenigen Cytochrommoleküle darstellen, die erst durch laterale Wanderung erreicht werden. Die Tatsache, daß Cytochrom P-450 auch während der Oxidation durch Cumolhydroperoxid biphasisch und zu etwa gleichen Anteilen schnell und langsam reagiert wie nach NADPH-Zugabe, läßt Zweifel an der Richtigkeit der Interpretation Estabrooks aufkommen. Die experimentellen Ergebnisse lassen eher auf eine Population verschiedener Arten von Cytochrom P-450 schließen.

Einen wichtigen Beitrag zum Verständnis des Reaktionsmechanismus der mikrosomalen Hydroxylierung lieferte schließlich die Verwendung des Oxendonors 3-Chloroperbenzoesäure. Die Tatsache, daß Tyr_2-Cu^{2+} in diesem Fall nicht inhibiert, macht nochmals deutlich, daß dessen Wirkung nicht auf einem unspezifischen Effekt an Cytochrom P-450, wie ihn etwa eine Änderung des Spin-Zustandes des Eisens durch das Kupfer darstellen könnte, zurückzuführen ist. Offensichtlich überträgt der Oxendonor ein Sauerstoffatom auf das Cytochrom, ohne daß O_2^- beteiligt ist. Aus diesem Grund inhibiert das Dismutase-aktive Tyr_2-Cu^{2+} die Reaktion an Cytochrom P-450 in diesem Falle nicht.

4.4. Zur Beteiligung von OH˙ am Hydroxylierungsmechanismus

OH˙ Radikale könnten in Mikrosomen über den Haber-Weiss-Zyklus (51) oder durch Reaktion zwischen reduzierten Eisenionen und H_2O_2 entstehen. Die Beteiligung von OH˙ am Hydroxylierungsmechanismus läßt sich in einigen Fällen aufgrund von Modellversuchen ausschließen; in anderen Fällen läßt sie sich nicht mit der Stöchiometrie der Reaktion in Einklang bringen. Trotzdem sollte wegen der Vielfalt der Monoxygenasereaktionen eine solche Beteiligung nicht von vornherein ausgeschlossen werden, zumal alle zur Bildung von OH˙ notwendigen Vorläufer in Mikrosomen vorkommen und die Stöchiometrie der Monoxygenasereaktion nur für wenige Fälle gesichert ist.

Eine Anzahl von Verbindungen, die OH˙ abfangen, wurde als Inhibitoren der Cytochrom P-450-abhängigen mikrosomalen Hydroxylierung getestet. Unpolare Quencher erwiesen sich dabei als sehr viel wirkungsvoller als polare. Anschließend wurde der Mechanismus der Inhibierung durch diese Quencher näher untersucht. Sowohl eine Transformation als auch eine Inhibierung von NADPH-Cytochrom c Reduktase wurde ausgeschlossen. Interessanterweise stimulierte Methional sogar das Enzym. Diese Stimulierung war recht spezifisch, denn einige andere Aldehyde oder Schwefelverbindungen zeigten diesen Effekt nicht.

Durch kinetische Untersuchungen nach Lineweaver und Burk sollte festgestellt werden, ob die verwendeten Substanzen mit dem Substrat um das aktive Zentrum der terminalen Oxidase konkurrieren. Diese Analysen ergaben jedoch keine eindeutige

Antwort, da für die einzelnen Substanzen keine einheitlichen Inhibierungstypen gefunden werden konnten. Eine Erklärung hierfür wäre etwa, daß der Transport der Substanzen durch die Mikrosomenmembran bei niedrigen Konzentrationen geschwindigkeitsbestimmend ist und die kinetischen Messungen nicht den Mechanismus der Hydroxylierung untersuchen.
Eine weitere Möglichkeit zu untersuchen, ob die verwendeten Quencher die Dealkylierung der verwendeten Substrate inhibierten, da sie selbst als Substrate verstoffwechselt werden, ist die Messung der Sauerstoffaufnahme. Ist diese in Anwesenheit eines Quenchers nicht stimuliert, so wirkt der Quencher eindeutig nicht als Substrat. Eine Stimulierung der Sauerstoffaufnahme kann sowohl bedeuten, daß der Quencher ein Substrat der terminalen Oxidase ist, als auch, daß er als Entkoppler wirkt. Es wurde gefunden, daß Methional und Dimethoxyäthan die Sauerstoffaufnahme im Gegensatz zu t-Butanol stimulierten.
Schließlich kann durch Messung der Formaldehydbildung in einigen Fällen bestimmt werden, ob die Quencher als Substrate in die Reaktion eingehen. Im Fall von Methional wäre auch eine Oxidation am Schwefel anstelle einer Dealkylierung denkbar. Methional und Dimethoxyäthan stimulierten die Bildung von Formaldehyd, während auch mit dieser Methode keine Verstoffwechselung von t-Butanol feststellbar war.
Eine eindeutige Schlußfolgerung aus diesen Messungen ist nicht zu ziehen. Die kinetischen Analysen gaben keinen klaren Aufschluß über den Hemmtyp, eine Stimulierung der Sauerstoffaufnahme bedeutet nicht unbedingt, daß eine Hydroxylierung vorliegen muß, und die Bildung von Formaldehyd könnte auch auf

einer Reaktion der Quencher mit OH· beruhen.
Für eine Beteiligung von OH· am mikrosomalen Hydroxylierungsmechanismus sprechen am ehesten die Kontrollversuche, die mit t-Butanol durchgeführt wurden. In Gegenwart dieses OH·-Quenchers, der die Dealkylierung von p-Nitroanisol und 7-Äthoxycoumarin inhibiert, findet man weder eine Stimulierung der Sauerstoffaufnahme noch der Formaldehydproduktion, Befunde, die zeigen, daß dieser Quencher kein Substrat der Reaktion ist.

Ein direkter Beweis für die Beteiligung von OH· ist wohl nicht möglich, da nur die Möglichkeit besteht, Alternativen wie Transformation, Änderung des spin-Zustandes von Cytochrom P-450, Kompetition usw. auszuschließen. Solange keine Enzyme oder andere Verbindungen gefunden werden, die spezifisch und unter definierter Produktbildung mit OH· reagieren, wird der Nachweis wohl nicht endgültig geführt werden können.

4.5. Zur Beteiligung von O_2^- und OH· am Hydroxylierungsmechanismus in intakten Methylcholanthren-induzierten Mikrosomen

Die mikrosomale Monoxygenase ist verantwortlich für die Detoxifikation von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen. Während dieses Prozesses können sich aus den ursprünglich relativ inerten Verbindungen auch Metabolite bilden, die cancerogen sind. Der Stoffwechsel vollzieht sich an Cytochrom P-448 als terminaler Oxidase, die die polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe an vielen Positionen zu Metaboliten oxidiert, die in weiteren enzymatischen und nichtenzymatischen

Reaktionen zu Phenolen, Dihydrodiolen, Chinonen und Konjugaten umgewandelt werden können.

Bisher am besten untersucht ist der Stoffwechsel von Benzpyren durch Mikrosomen, in denen Cytochrom P-448 mit Hilfe von Methylcholanthren induziert wurde. Mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie konnte eine Vielzahl von Benzpyrenmetaboliten aufgetrennt und charakterisiert werden. Einige dieser Metabolite sind cancerogen oder Vorläufer cancerogener Verbindungen. Über den Mechanismus der Bildung der oxygenierten Derivate von polycyclischen Kohlenwasserstoffen ist jedoch wenig bekannt. In einigen Fällen ist als Primärreaktion die Bildung eines Epoxids gefunden worden.

Nachdem sich herausgestellt hatte, daß O_2^- und möglicherweise in einigen Fällen auch $OH^\bullet$ am Hydroxylierungsmechanismus beteiligt ist, der an Cytochrom P-450 als terminaler Oxidase abläuft (3.4.), wurde der Cytochrom P-448-abhängige Stoffwechsel von Benzpyren auf eine Beteiligung von O_2^- und $OH^\bullet$ untersucht.

Die mikrosomale Bildung von Benzpyrenderivaten konnte sowohl durch Tyr_2-Cu^{2+} als auch Kupferkomplexe von Aspirinderivaten, Verbindungen, die eine hohe Superoxid Dismutaseaktivität aufweisen, inhibiert werden. Da keine Transformation von Cytochrom P-448 zur inaktiven Form Cytochrom P-420 durch diese Verbindungen festgestellt wurde, und auf Grund der Kontrollversuche zur Wirkungsweise von Tyr_2-Cu^{2+} in der Cytochrom P-450-abhängigen Monoxygenasereaktion kann geschlossen werden, daß O_2^- eine wichtige Zwischenstufe während der Sauerstoffaktivierung an Cytochrom P-448 darstellt.

Interessanterweise inhibiert Tyr_2-Cu^{2+} die Bildung der Derivate, die in den hier dargestellten Untersuchungen bestimmt werden konnten, nicht in gleichem Maß. Durch Vergleich des fluorimetrischen mit dem radioaktiven Test sowie durch Dünnschichtchromatographie wurde festgestellt, daß die Bildung von 3-Hydroxybenzpyren durch niedrigere Konzentrationen von Tyr_2-Cu^{2+} inhibiert wird als sie zur Inhibierung des Gesamtstoffwechsels von Benzpyren nötig sind. Daraus kann geschlossen werden, daß sich der mikrosomale Stoffwechsel von Benzpyren differentiell beeinflussen läßt. Mit einer verbesserten Analytik und unter Verwendung verschiedener Inhibitoren sollte daher untersucht werden, ob nicht die Bildung bestimmter cancerogener Metabolite des Benzpyren verhindert werden kann. Eine Beteiligung von $OH^{\bullet}$ an der Cytochrom P-448-abhängigen Sauerstoffaktivierung liegt vermutlich nicht vor, da Verbindungen, die mit $OH^{\bullet}$ reagieren, den Cytochrom P-448-abhängigen Stoffwechsel von Benzpyren nicht inhibierten. Im Gegensatz dazu war gefunden worden (3.4.), daß eine Inhibierung des Cytochrom P-450-abhängigen Stoffwechsels durch diese Verbindungen vorliegt. Dieser Befund ist vielleicht nicht allzu überraschend, da schon Ullrich und Staudinger (129) berichteten, daß $OH^{\bullet}$ keine Epoxide oder Dihydrodiole an Doppelbindungen bildet, und da keine Wanderung eines Substituenten während der Hydroxylierung am Aromaten stattfindet (99). Die verschiedene Wirkungsweise der $OH^{\bullet}$-Quencher an den Cytochromen P-448 und P-450 läßt daher vermuten, daß die Inhibierung an Cytochrom P-450 spezifisch ist, d.h. auf Grund ihrer Reaktion mit $OH^{\bullet}$ stattfindet.

4.6. Zur Beteiligung von $O_2^{\cdot}$ am mikrosomalen Hydroxylierungsmechanismus

Die Beteiligung von $O_2^{\cdot}$ am mikrosomalen Hydroxylierungsmechanismus wurde verschiedentlich diskutiert. Daher wurde in dieser Arbeit versucht, mittels Verbindungen, die spezifisch mit dieser Sauerstoffspezies reagieren, eine solche Beteiligung nachzuweisen. Zugabe von lipophilen oder hydrophilen $O_2^{\cdot}$ -Quenchern in hohen Konzentrationen führte zu keiner Inhibierung der mikrosomalen Hydroxylierungsreaktionen. Aus diesem Grunde ist es unwahrscheinlich, daß $O_2^{\cdot}$ eine bedeutende Rolle im mikrosomalen Hydroxylierungsmechanismus spielt.

4.7. Zum Mechanismus der Sauerstoffaktivierung an der terminalen Oxidase und zur Beteiligung von O_2^-

Abschließend kann gesagt werden, daß die hier geschilderten Versuche den Schluß zulassen, daß O_2^- am Hydroxylierungsmechanismus sowohl am Cytochrom P-450 als auch am Cytochrom P-448 in intakten Rattenlebermikrosomen beteiligt ist. Mit Hilfe niedermolekularer Verbindungen, die Superoxid Dismutaseaktivität aufweisen, konnte die Hydroxylierungsreaktion inhibiert werden. Kontrollversuche zeigten am Beispiel von Tyr_2-Cu^{2+}, daß der Inhibitor weder als Substrat fungiert noch die Reduktion der mikrosomalen Pigmente Cytochrom b_5 und Cytochrom P-450 inhibiert. Auch wirkt das redox-aktive Kupferion des Komplexes selbst nicht als Elektronenakzeptor. Vielmehr benötigt es die Gegenwart von Sauerstoff, um seine inhibierende Wirkung auszuüben. Die Ergebnisse der Unter-

suchungen zur Sauerstoffaufnahme während der inhibierten Reaktion stehen im Einklang mit den vorherigen Befunden, daß O_2^- am Hydroxylierungsmechanismus beteiligt ist. Untersuchungen der Cumolhydroperoxid-abhängigen Hydroxylierung bestätigten den Schluß, daß der verwendete Inhibitor an Cytochrom P-450 wirksam ist, und mit Hilfe eines Oxendonors wurde gezeigt, daß die Hydroxylierungsreaktion nicht inhibiert ist, wenn O_2^- nicht an der Reaktion beteiligt ist. In Abb. 34 ist ein Reaktionsschema dargestellt, wie es aufgrund dieser Befunde aufgestellt werden kann. Tyr_2-Cu^{2+} inhibiert die NADPH-abhängige Reaktion durch Dismutation von O_2^- im ternären Komplex. O_2^- tritt dabei sowohl nach Zugabe des ersten als auch des zweiten Elektrons auf. Auch die Cumolhydroperoxid-abhängige Reaktion wird von dem Kupferkomplex inhibiert, offensichtlich, da auch in diesem Fall O_2^- in den Reaktionsmechanismus eingeht. Auf der Stufe des Ferryl-ions, das direkt mit Hilfe eines Oxendonors oder durch Wasserabspaltung aus dem ternären Fe^{3+}-Peroxidkomplex gebildet wird, ist Tyr_2-Cu^{2+} unwirksam, da auf dieser Stufe O_2^- nicht mehr am Reaktionsmechanismus beteiligt ist. Zur Vereinfachung ist in diesem Schema unberücksichtigt geblieben, daß der aktivierte Sauerstoff möglicherweise nicht an das Hämeisen gebunden ist, sondern in einer Persäure oder in einem Peramid auftritt (vgl. 4.1.).

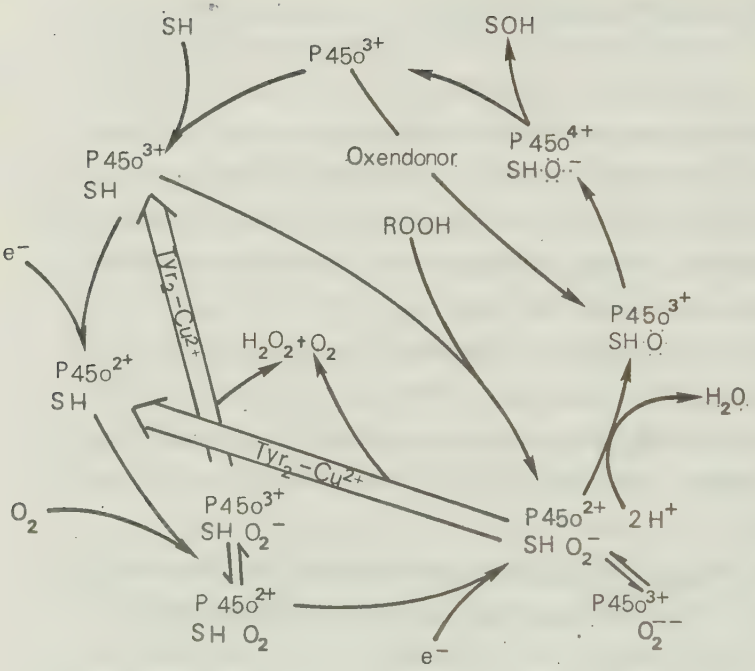


Abb. 34: Schematische Darstellung des Mechanismus der Sauerstoffaktivierung während der mikrosomalen Hydroxylierung und Wirkungsweise der Inhibierung durch das Superoxid Dismutase-aktive Tyr_2-Cu^{2+}.

P $45o^{3+}$: oxidiertes Cytochrom P-45o

P $45o^{2+}$: reduziertes Cytochrom P-45o

SH: Substrat

SOH: hydroxyliertes Substrat

ROOH: Cumolhydroperoxid

Die beiden Elektronen werden von dem physiologischen Reduktionsmittel NADPH geliefert.

5. Zusammenfassung

Einleitend wurden zunächst die Eigenschaften von Sauerstoff und seinen Reduktionsprodukten diskutiert. Anschließend wurde auf die Eigenschaften und Funktionen von Oxygenasen mit besonderer Berücksichtigung des mikrosomalen Hydroxylierungssystems eingegangen. Schließlich wurden mögliche Mechanismen der Aktivierung des Sauerstoffs an der terminalen Oxidase während der Einführung des Sauerstoffatoms in ein Substrat erörtert. Auf die besondere Bedeutung der Untersuchungen am rekonstituierten mikrosomalen System wurde hingewiesen.

Im experimentellen Teil sind die Untersuchungen zur Beteiligung aktiver Sauerstoffspezies am Hydroxylierungsmechanismus in intakten Rattenlebermikrosomen beschrieben. Das Superoxid Radikal O_2^- wurde als wichtige Zwischenstufe des Hydroxylierungsmechanismus an den Cytochromen P-450 und P-448 identifiziert: Mit Hilfe niedermolekularer Cu^{2+}-Komplexe, welche eine hohe und spezifische Superoxid Dismutaseaktivität aufweisen, konnte die Hydroxylierung einer Vielzahl von Substraten inhibiert werden. Es wurde gezeigt, daß die Kupferkomplexe weder den Elektronenfluß von NADPH zur terminalen Oxidase inhibieren noch selber direkt, d.h. in Abwesenheit von Sauerstoff, reduziert werden. Auch eine Transformation der terminalen Oxidase zur inaktiven Form von Cytochrom P-420 durch die Komplexe lag nicht vor. Die Sauerstoffaufnahme durch Mikrosomen in Gegenwart der Komplexe stand im Einklang mit der Wirkung der Komplexe als Dismutasen von O_2^-. Untersuchungen mit Hilfe von Cumolhydroperoxid zeigten, daß die inhibierende Wirkung

der Komplexe direkt an der terminalen Oxidase lokalisiert ist und auch bei Verwendung von Cumolhydroperoxid wahrscheinlich in einer Dismutation von O_2^- zu suchen ist. Durch Verwendung des Oxendonors 3- Chlorperbenzoesäure konnte die Spezifität der Komplexe bestätigt werden. Bei der Oxendonor-abhängigen Hydroxylierung wurde kein O_2^- gemessen; eine Inhibierung durch die Komplexe wurde nicht festgestellt. Daher kann eine unspezifische Wechselwirkung etwa zwischen dem Kupfer des Komplexes und dem Eisen der terminalen Oxidase ausgeschlossen werden.

Die Beteiligung von OH$^\cdot$ Radikalen am Reaktionsmechanismus der mikrosomalen Hydroxylierung wurde über eine Inhibition mit Verbindungen untersucht, die mit diesem Radikal reagieren. Kontrollversuche zeigten, daß die Inhibierung der Cytochrom P-450-abhängigen Reaktion mit einem Abfangen von OH$^\cdot$ durch diese Verbindungen im Einklang steht, OH$^\cdot$ also auf Grund dieser Befunde als wichtige Zwischenstufe bei der Hydroxylierung wenigstens einiger Substrate anzunehmen ist. Die Hydroxylierung des polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffes Benzpyren mit Cytochrom P-448 als terminaler Oxidase wird dagegen von Verbindungen, die mit OH$^\cdot$ reagieren, nicht inhibiert, sondern ist sogar etwas stimuliert. OH$^\cdot$ als wichtige reaktive Zwischenstufe während dieses Hydroxylierungsmechanismus scheint daher ausgeschlossen zu sein. O_2^* konnte als reaktive Zwischenstufe am Hydroxylierungsmechanismus ausgeschlossen werden, da weder hydrophile noch lipophile Verbindungen, die schnell und spezifisch mit dieser Sauerstoffspezies reagieren, die Hydroxylierung inhibierten.

Untersuchungen des Cytochrom P-448-abhängigen Stoffwechsels von Benzpyren zeigten, daß die mikrosomale Bildung der verschiedenen Benzpyrenmetabolite durch Tyr_2-Cu^{2+} in unterschiedlichem Ausmaß gehemmt ist.

Die Untersuchungen lassen den Schluß zu, daß das Superoxid Radikal O_2^- eine wichtige Zwischenstufe während der Sauerstoffaktivierung in intakten Rattenlebermikrosomen darstellt, $OH^\cdot$ Radikale wahrscheinlich an einigen Hydroxylierungsreaktionen beteiligt ist, $O_2^{\pm}$ aber höchstwahrscheinlich keine Rolle im Hydroxylierungsmechanismus spielt.

6. Literaturverzeichnis

1. Fridovich,I. (1974) Advan.Enzymol. 41, 35 - 97
2. Bors,W., Saran,M., Lengfelder,E., Spöttl,R. und Michel,C. (1974) Curr.Top.Rad.Res.Quart. 9, 247 - 309
3. McCord,J.M. und Fridovich,I. (1968) J.Biol.Chem. 243, 5753 - 5760
4. Behar,D., Czapski,G., Dorfman,L.M., Rabani,J. und Schwarz,H.A. (1970) J.Phys.Chem. 74, 3209
5. Khan,A.U. (1970) Science 168, 476-477
6. McCord,J.M. und Fridovich,I. (1969) J.Biol.Chem. 244, 6049 - 6055
7. McCord,J.M., Keele,B.B. und Fridovich,I.(1971) Proc. Natl.Acad.Sci.U.S. 68, 1024 - 1027
8. Gregory,E.M. und Fridovich,I.(1973) J.Bacteriol.114, 543-548
9. Weisinger,R.A. und Fridovich,I.(1973) J.Biol.Chem.248, 4793 - 4796
10. Keele,B.B., McCord,J.M. und Fridovich,I.(1970) J.Biol.Chem. 245, 6176 - 6181
11. Weisinger,R.A. und Fridovich,I.(1973), J.Biol.Chem.248, 3582 - 3592
12. Yost, F.J. und Fridovich,I. (1973), J.Biol.Chem.248, 4905 - 4908
13. Malmström,B.G., Andreasson,L.-E. und Reinhamma (1976) in: The Enzymes(Boyer,P.D.Hrsg.) 533 - 557
14. Paschen,W. und Weser,U.,(1973) Biochim.Biophys.Acta 327, 217 - 222
15. Brigelius,R., Spöttl,R., Bors,W., Lengfelder,E., Saran,M. und Weser,U.(1974) FEBS.Lett.47, 72-75

16. Paschen,W. und Weser,U.(1975) Hoppe-Seyler's Z.Physiol. Chem. 356, 727 - 737
17. McCord,J.M. und Fridovich,I.(1968) J.Biol.Chem.243, 5753-5760
18. Azzi,A., Montecucco,C. und Richter,C.(1975) Biochem. Biophys.Res.Commun.65, 597-603
19. Rajagopalan,K.V. und Handler,P.(1964) J.Biol.Chem.239, 2022-2026
20. McCord,J.M. und Fridovich,I.(1969) J.Biol.Chem.244, 6056-6063
21. Miller,R.W. und Massey,V.(1965) J.Biol.Chem.240, 1466-1472
22. Nilsson,R., Pick,F.M. und Bray,R.C.(1969) Biochim. Biophys.Acta 192, 145-148
23. Harbour,J.R. und Bolton,J.R.(1975) Biochem.Biophys. Res.Commun.64, 803-807
24. Rapp,U., Adams,W.C. und Miller,R.W.(1973) Can.J.Biochem,51, 158-171
25. Hodgson,E.K. und Fridovich,I.(1973) Biochem.Biophys. Res.Commun.54, 270-274
26. Thurman,R.G., Hesse,S. und Scholz,R.(1974) in: Alcohol and Acetaldehyde Metabolizing Systems, R.G.Thurman, T.Yonetani, J.R.Williamson und B.Chance Hrsg.Academic Press
27. Vernon-Roberts,B., The Macrophage, Cambridge University Press (1972)
28. Boveris,A. und Chance,B.(1973) Biochem.J.134, 707 - 716
29. Loschen,G., Azzi,A., Richter,C. und Flohé,C.(1974) FEBS Lett.42, 68-72
30. Andreae,W.A.(1955) Nature 175, 859-860

31. Oshino,N., Oshino,R. und Chance,B.(1973) Biochem.J. 131, 555-563

32. Sies,H. und Chance,B.(1970) FEBS Lett.11, 172-176

33. Allen,A.O.,(1960) The Radiation Chemistry of Water and Aqueous Solutions, Van Nostrand, London und Princeton,N.J.

34. Hochanadel,C.J.(1962) Radiat.Res.17, 286

35. Ilan,Y.A., Czapski ,G. und Meisel,D.(1976) Biochim. Biophys.Acta 430, 209-224

36. Simic,M.G., Taub,I.A., Tocci,J. und Hurwitz,P.A.(1975) Biochem.Biophys.Res.Commun.62, 161-167

37. Rabani,J.(1962) J.Phys.Chem.66, 361-362

38. Fridovich,I.(1972) Act.Chem.Res.5, 321-326

39. Kellog,E.W. und Fridovich,I.(1975) J.Biol.Chem.250, 8812-8817

40. Anbar,M. und Neta,P.(1967) Int.J.Appl.Radiat.Isot.18, 493-523

41. Cohen,G. und Heikkila,R.E.(1974) J.Biol.Chem.249,2447-2452

42. Dougherty,T., Grindey,G.,Fiel,R., Weishaupt,K. und Boyle,D.(1975) J.Natl.Cancer Inst.55, 115-12o

43. King,M.M., Lai,E.K. und McCay,P.B.(1975) J.Biol.Chem.250, 6496-6502

44. Finazzi Agrò,A., Giovangnoli,C., Del Sole,P., Calabrese,L., Rotilio,G. und Mondovi,B.(1972) FEBS Lett.21, 183-185

45. Matheson,I.B.C., Etheridge,R.D., Kratowich,N.R. und Lee,J.(1975) Photochem.Photobiol.21, 165-171

46. Porter,D.J.T. and Ingraham,L.L.(1974) Biochim.Biophys. Acta 334, 97-102

47. Wassermann,H.H. und Scheffer,J.R.(1967) J.Am.Chem.Soc.89, 3o73-3o75

48. Kearns,D.R. (1971) . . Chem.Rev.72, 395-427

49. Foote,C.S. and Denny,R.W. (1968) J.Am.Chem.Soc.90, 6233-6235

50. Ouanness,C. and Wilson,T. (1968) J.Am.Chem.Soc.90, 6527-6528

51. Haber,F. und Weiss,J. (1934) Proc.Roy.Soc.London 147, 332-351

52. Klingenberg,M. (1958) Arch.Biochem.Biophys.75, 376-386

53. Garfinkel,D. (1958) Arch.Biochem.Biophys.77, 493-509

54. Cooper,D.Y., Levin,S., Narasimhulu,S., Rosenthal,O. und Estabrook,R.W. (1965) Science 147, 400-402

55. Omura,T. und Sato,R. (1963) Biochim.Biophys.Acta,71, 224-226

56. Omura,T. und Sato,R. (1964) J.Biol.Chem.239, 2370-2378

57. Remmer,H. und Merker,H.J. (1963) Science 142, 1657-1659

58. Lu,A.Y.H. und Coon,M.J. (1968)J.Biol.Chem.243,1331-1332

59. Lu,A.Y.H., Junk,K.W. und Coon,M.J. (1969) J.Biol.Chem.244, 3714-3721

60. Alvares,A.P., Schilling,G., Levin,W. und Kuntzman,R.(1967) Biochem.Biophys.Res.Commun.30, 607-612

61. Ichikawa,Y. und Yamano,T. (1967) Biochim.Biophys.Acta 131, 490-497

62. Ichikawa,Y. und Yamano,T. (1967) Biochim.Biophys.Acta 147, 518-525

63. Gunsalus,I.C., Pederson,T.C. und Sligar, S.G.(1975) Ann.Rev.Biochem.44, 377-407

64. Horecker,B.L. (1950) J.Biol.Chem.183, 593-605

65. Bilimoria,M.H. und Kamin,H. (1973) Ann.N.Y.Acad.Sci.212, 428-448

66. Prough,R.A. und Masters,B.S.S.(1973) Ann.N.Y.Acad.Sci 212, 89-93

67. Pederson,T.C. und Aust,S.D. (1973) Biochem.Biophys. Res.Commun.52, 1071-1078

68. Strittmatter,P. und Velick,S.F. (1957) J.Biol.Chem.228, 785-799

69. Strittmatter,P. (1965) Fed.Proc.Fed.Amer.Soc.Exp.Biol.24, 1156-1163

70. Oshino,N., Imai,Y. und Sato,R. (1971) J.Biochem.(Tokyo)69, 155

71. Strobel,H.W., Lu,A.Y.H., Heidema,J. und Coon,M.J.(1970) J.Biol.Chem.245, 4851-4854

72. Estabrook,R.W.,Franklin,M., Baron,J., Shigematsu,A. und Hildebrandt,A.H. (1971) in: Drugs and Cell Regulation (Mihish, E., Hrsg.) 227-257, Acad.Press, New York und London

73. Estabrook, R.W. (1972) Miami Winter Symposium (Schultz, J. und Cameron,B.F.Hrsg.) Acad. Press Vol. 4, 248

74. Salerno,J.C. und Ingledew,W.J. (1975) 65,Biochem.Biophys. Res.Commun., 618-624

75. Caygill,C.P.J., Diplock,A.T. und Jeffery,E.H. (1973) Biochem.J.136, 851-858

76. Cohen,B.S. und Estabrook,R.W. (1971) Arch.Biochem.Biophys.143, 37-45

77. Lu,A.Y.H., West,S.B., Vore,M., Ryan,D. und Levin,W.(1974) J.Biol.Chem. 249, 6701-6709

78. Hrycay E.G. und O'Brien,P.J. (1974) Arch.Biochem.Biophys.160, 230-245

79. Staudt,H., Lichtenberger,F. und Ullrich,V. (1974) Eur.J.Biochem.46, 99-106

95. Halliwell,B. und Ahluwalia,S. (1976) Biochem.J.153, 513-518

96. Foote,C.S. (1968) Accounts Chem.Res.1, 104-110

97. Wasserman,H.H., Scheffer,J.R. und Cooper,J.L. (1972) J.Amer.Chem.Soc.94, 4991-4996

98. Hamilton,G.A. (1964) J.Amer.Chem.Soc.86, 3391-3392

99. Guroff,G., Daly,J.W., Jerina,D.M., Renson,J., Witkop,B. und Udenfriend,S. (1967) Science 157, 1524-1530

100. Boyd,D.R., Daly,J.W. und Jerina,D.M. (1972) Biochemistry 11, 1961 - 1966

101. Lichtenberger,F., Nastainczyk,W. und Ullrich,V. (1976) Biochem.Biophys.Res.Commun.70, 939-946

102. Weitzel,G., Fretzdorff,A.M. und Schneider,F. (1957) Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Ch. 307, 14-22

103. Chance,B., De Vault,D., Legallais,V., Mela,L. und Yonetani,T. (1967) Nobel Symposium 5 (Claesson,S.Hrsg.) Interscience

104. Remmer,H., Greim,H., Schenkman,J.B. und Estabrook,R.W. (1967) Methods Enzymol.X, 703-708

105. Modirzadeh,J. und Kamin,H. (1965) Biochim.Biophys.Acta 99, 205-226

106. Ullrich,V. und Weber,P. (1972) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Ch.353, 1171-1177

107. Nash,T. (1953) Biochem.J.55, 416-421

108. McLean,A.E.M. und Day,P.A. (1974) Biochem.Pharm.23, 1173-1180

109. Nebert,D.W. und Gelboin,H.V. (1968) J.Biol.Chem.243, 6242-6249

80. Estabrook,R.W., Hildebrandt,A., Remmer,H., Schenkman,J.B., Rosenthal,O. und Cooper,D.Y. Collog.Ges.Biol.Chem. No.19, 142

81. Franklin,M.R. und Estabrook,R.W.(1971) Arch.Biochem. Biophys.143, 318-329

82. Yang,C.S. (1975) FEBS Lett.54, 61-64

83. Peterson,J.A., Ebel.R.E. und O'Keeffe,D.H., Matsubara,T. und Estabrook,R.W. (1976) J.Biol.Chem.251, 4010-4016

84. Wikström,M.F.K. (1973) Biochim.Biophys.Acta 301,155-193

85. Strobel,H.W. und Coon,M.J. (1971) J.Biol.Chem.246, 7826 - 7829

86. Hamilton,G.A. (1969) Advan.Enzymol.32, 55-96

87. Hamilton,G.A. (1971) in: Progress in Bioorganic Chemistry (Kaiser,E.T. und Kezdy,F.J. Hrsg.) 1, 83

88. Collman,J.P. (1968) Accounts Chem.Res. 1, 136-143

89. Misra,H.P. und Fridovich,I. (1972) J.Biol.Chem.247, 188-192

90. Ullrich,V. und Staudinger,H.J. (1971) in: Handbook of Experimental Pharmacology.Springer Verlag (Brodie,B.B. und Gilette,J.Hrsg.) Vol.XXVIII, 251-263

91. Hamilton,G.A. (1974) in: Molecular Mechanismus of Oxygen Activation (Hayaishi,O.Hrsg.) 405-451

92. Prema Kumar, Ravindranath,C.S., Vaidyanethan,C.S. und Rao,N.A. (1972) Biochem.Biophys.Res.Commun.48, 1049-1054

93. Prema Kumar, Ravindranath,C.S., Vaidyanethan,C.S. und Rao,N.A. (1972) Biochem.Biophys.Res.Commun.48, 1422-1426

94. Goscin,S.A. und Fridovich,I. (1972) Arch.Biochem.Biophys. 153, 778-783

110. DePierre,J.W., Moron,M.S., Johannesen,K.A.M., und Ernster,L. (1975) Anal.Biochem.63, 470-484

111. Kinoshita,N., Shears,B. und Gelboin,H.V. (1973) Cancer Res.33, 1937-1944

112. Czapski,G.H. und Bielski,M.J. (1963) J.Phys.Chem.67, 2180-2187

113. Hrycay,E.G., Gustafsson,J.A., Ingelman-Sunderberg,M. und Ernster,L. (1976) Eur.J.Biochem.61, 43-52

114. Nagata,C., Inomata,M., Kodama,M. und Tagashira,Y.(1968) Gann 59, 289-298

115. Misra,H.P. und Fridovich,I. (1972) J.Biol.Chem.247, 3170-3175

116. Aust,S.D., Roerig,D.L. und Pederson,T.C. (1972) Biochem. Biophys.Res.Commun.47, 1133-1137

117. Richter,C., Azzi,A. und Wendel,A. (1976) FEBS Lett.64, 332-337

118. McCord,J.M. (1974) Science 185, 529-531

119. Willis,A.L. (1969) J.Pharm.Pharmacol.21, 126-128

120. Oyanagui,Y. (1976) Biochem.Pharmacol.25, 1465-1472

121. Sorensen,J.R.J. (1976) J.Med.Chem.19, 135-148

122. Younes,M., Wendel,A., Weser,U., Richter,C. und Azzi,A. (1977) Biochem.Biophys.Acta, zur Veröffentlichung eingereicht

123. Richter,C., Azzi,A., Weser,U. und Wendel,A. (1977) J.Biol.Chem. im Druck

124. Estabrook,R.W., Baron,J.,Franklin,M., Mason,I., Waterman,M. und Peterson,J. (1972) Miami Winter Symposium (Schultz,J. und Cameron,B.F.Hrsg.) Academic Press Vol.4, 197-230

125. Chance,B., (1943) J.Biol.Chem.151, 553-577

126. Cohen,B.S. und Estabrook,R.W. (1973) Arch.Biochem. Biophys.143, 46-53

127. Hrycay,E.G., Gustafsson,J.A., Ingelman-Sundberg,M. und Ernster,L. (1975) Biochem.Biophys.Res.Commun.66, 209-216

128. Gigon,P.L. Gram,T.E. und Gilette,J.R. (1969) Mol.Pharmacol.5, 109-122

129. Ullrich,V. und Staudinger,Hj. (1966) in: Biological and Chemical Aspects of Oxygenases (Bloch, Hayaishi, Hrsg.), Maruzen Com.Ltd.,Tokyo

130. Ullrich,V., Hey,D., Staudinger,Hj., Büch,H. und Rummel,W. (1967) Biochem.Pharmacol.16, 2237-2246

131. Breslow,R. und Lukens,L.N. (1960) J.Biol.Chem.235, 292-296

132. Ullrich,V. und Diehl,H. (1971) Eur.J.Biochem.20,509-512

133. Selkirk,J.K., Croy,R.G. und Gelboin,H.V. (1976) Cancer Res.36, 922-926

134. Wood,A.W., Levin,W., Lu,A.Y.H., Yagi,H., Jerina,M. und Conney,A.H. (1976) J.Biol.Chem.251, 4882-489o

135. Lesko,S., Caspary,W., Lorentzen,R. und Ts'o, P.O.P. (1975) Biochemistry 14, 3978-3984

136. George,P. (1965) The fitness of oxygen. In: Oxidases and Related Redox Systems (King, Mason und Morrison Hrsg.) Wiley, New York, London, Sidney

137. Ibne-Rasa,K.M. und Edwards,J. (1962) J.Amer.chem.Soc.84, 763-768

138. Sims,P. und Grover,P.L. (1974) Adv.Cancer Res.20,165-274

139. Daudel,P., Duquesne,M., Vigny,P., Grover,P.L. und Sims,P. (1975) FEBS Lett.57, 250-253

140. Newbold,R.F. und Brookes,P. (1976) Nature 261, 52-54

141. Kasper,C.B. (1970) J.Biol.Chem.245, 577-581

142. Uemura,T. und Chiesara,E. (1976) Eur.J.Biochem.66, 293-307

Lebenslauf

11.11.1945	Geboren in Quedlinburg, Sachsen-Anhalt, als achtes Kind des Studienrats Dr.Georg Richter und seiner Frau Elisabeth, geb. Gast
1952 - 1955	Volksschule Hardehausen, Westfalen
1955 - 1956	Volksschule Lorch, Württemberg
1956 - 1965	Parler-Gymnasium Schwäbisch Gmünd, Altsprachlicher Zweig
1965 - 1968	Studium der Veterinärmedizin an der Universität München. Beendet nach der Tierärztlichen Vorprüfung
1968 - 1970	Studium der Biochemie an der Universität Tübingen. 2.Teil des Vordiploms:April1970
1970 - 1972	Teaching assistant und graduate student am Department of Biology der Rice University, Houston, Texas, U.S.A. Arbeit über die Nucleinsäurebiosynthese in E.coli nach Infektion mit dem Phagen T 4. Abschluß mit dem akademischen Grad "Master of Arts"
1972 - 1977	Studium der Biochemie an der Universität Tübingen. Diplomprüfung: April 1974, Diplomarbeit ("Effekt des Selen-Antagonisten Tri-ortho-kresylphosphat auf den Lipidperoxidstoffwechsel der Maus in vivo und in vitro."):Mai 1974-Januar 1975, Doktorarbeit: Februar 1975-Februar 1977

Die Dissertation "Die Rolle aktiver Sauerstoffspezies im Hydroxylierungsmechanismus intakter Mikrosomen" wurde unter der Anleitung von Herrn Doz. Dr. A. Wendel am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen und im Laboratorium von Prof. A. Azzi, Istituto di Patologia Generale, Università di Padova, Italien, durchgeführt.

Meine akademischen Lehrer waren die folgenden Herren Professoren und Dozenten:

Physiologische Chemie	G. Weitzel, L. Flohé, W. Frank
Organische Chemie	E. Müller, E. Bayer, W. Kraus
Anorganische Chemie	W. Rüdorff, E. Stumpp
Physikalische Chemie	G. Kortüm, H. Mauser
Anatomie	P. Walter
Histologie	P. Walter
Zoophysiologie	G. Brüggemann
Zoologie	H. Liebmann
Botanik	L. Hörhammer
Physik	H. Faessler
Mathematik	W. Schweizer
Mikrobiologie	R. Storck, C. Stewart
Toxikologie	H. Remmer

difo-druck · 8600 bamberg
untere königstraße 30